

## BAB II. TINJAUAN PUSTAKA

### 2.1 Hasil Penelitian Terdahulu

Penelitian yang dilakukan oleh Maiya (2000), menyebutkan bahwa senyawa fotosensitizer (PS) yang digunakan dalam terapi fotodinamik (PDT) memiliki kriteria seperti dapat menyerap cahaya pada panjang gelombang 600-850 nm, memiliki kemampuan penetrasi cahaya ke dalam jaringan yang lebih besar, memiliki toksisitas yang rendah dalam keadaan gelap, memiliki aktivitas antikanker yang tinggi dengan adanya cahaya pada panjang gelombang yang sesuai, dapat menghasilkan oksigen singlet dengan jumlah yang cukup, dapat dikeluarkan dari tubuh dengan cepat, memiliki efek samping yang rendah terhadap sel normal.

Penelitian yang dilakukan oleh Ormond dan Freeman (2013), menyebutkan bahwa *phthalocyanine* (Pc) memiliki panjang gelombang maksimal 670-700 nm dan aktif pada daerah merah. Panjang gelombang maksimal Pc yang lebih besar memungkinkan bagi Pc untuk berpenetrasi ke jaringan yang lebih dalam, sehingga Pc dapat menghasilkan efek fotodinamik yang lebih besar dalam membunuh sel kanker. Penelitian yang dilakukan oleh Jinling *et al.* (2001), menyebutkan bahwa Pc memiliki fototoksitas yang rendah terhadap kulit karena Pc tidak mengalami proses absorpsi pada panjang gelombang *visible* ( $\lambda$  400-500 nm). Penelitian yang dilakukan oleh Frackowiak *et al.* (2001), menyebutkan bahwa kombinasi senyawa Pc dengan logam dapat menyebabkan terjadinya transisi logam dan memungkinkan terjadinya *intersystem crossing* yang lebih besar, sehingga jumlah oksigen singlet yang dihasilkan menjadi lebih besar.

Penelitian yang dilakukan oleh Syakilah (2019), menyebutkan bahwa hasil prediksi log P (koefisien partisi) dari Fe (II) *Phthalocyanine* (Fe(II)Pc) adalah 3,85. Hasil tersebut menunjukkan bahwa Fe(II)Pc termasuk senyawa yang bersifat lipofil, sehingga memungkinkan bagi Fe(II)Pc untuk terlokalisasi di dalam membran intraseluler dari sel kanker. Fe(II)Pc memiliki panjang gelombang sebesar 661 nm dan berada pada daerah merah pada cahaya tampak. Hal ini menunjukkan bahwa Fe(II)Pc dapat menembus

jaringan subkutan lemak yang berada di kedalaman 4-5 mm dari permukaan kulit.

Penelitian yang dilakukan oleh Staicu *et al.* (2013), menyebutkan bahwa Fe(II)Pc yang dilarutkan dengan pelarut DMSO memiliki nilai hidup oksigen singlet sebesar 6,0  $\mu$ s. Nilai hidup oksigen singlet ditentukan oleh jenis dan karakteristik fisika dan kimia dari suatu senyawa. Beberapa senyawa Pc memiliki nilai hidup oksigen singlet yang berbeda. Perbedaan tersebut sangat tergantung pada karakteristik dari logam diamagnetik atau logam paramagnetik yang digunakan untuk membentuk kompleks logam-*phthalocyanine*.

Penelitian yang dilakukan oleh Silva *et al.* (2017), menyebutkan bahwa Fe(II)Pc memiliki panjang gelombang sebesar 661 nm dalam pelarut DMSO, sedangkan dalam pelarut THF, Fe(II)Pc memiliki panjang gelombang sebesar 708 nm. Panjang gelombang Fe(II)Pc menunjukkan bahwa Fe(II)Pc berada pada daerah merah pada cahaya tampak. Fe(II)Pc memiliki nilai hidup fluoresensi sebesar 2,28 ns dalam pelarut DMSO, sedangkan dalam pelarut THF, Fe(II)Pc memiliki nilai hidup fluoresensi sebesar 2,90 ns.

Penelitian mengenai aktivitas antikanker dan toksisitas senyawa Fe(II)Pc sebagai PS dalam PDT belum banyak dilakukan. Belum adanya penelitian mengenai senyawa Fe(II)Pc yang diujikan secara langsung pada sel kanker payudara (T47D). Dengan demikian, perlu kiranya peneliti melakukan penelitian ini.

## **2.2 Landasan Teori**

### **2.2.1 Kanker Payudara**

Kanker payudara merupakan salah satu jenis kanker dimana sel kanker terbentuk dan menyerang jaringan payudara. Pada kanker payudara, sel di dalam payudara tumbuh secara tidak normal dan tidak terkendali. Sel kanker tersebut dapat menyerang jaringan payudara, jaringan lemak, pembuluh darah, komponen kelenjar seperti epitel saluran maupun lobulusnya dan persyarafan jaringan payudara.

Penelitian yang dilakukan oleh Anggorowati (2013), menyebutkan bahwa terdapat 4 variabel yang berhubungan dengan kanker payudara, yaitu obesitas, usia melahirkan anak pertama, riwayat pemberian ASI, dan usia *menarche*. Penelitian dilakukan menggunakan sampel penelitian berupa wanita penderita kanker payudara dengan jumlah 59 orang dan sampel kontrol yang berupa wanita bukan penderita kanker payudara dengan jumlah 59 orang. Sampel penelitian diperoleh dengan teknik total sampling. Variabel bebas yang digunakan dalam penelitian berupa karakteristik responden seperti umur, obesitas, riwayat keluarga kanker payudara, riwayat keluarga kanker ovarium, usia melahirkan anak pertama, riwayat pemberian ASI, usia *menarche*, usia *menopause*, riwayat pemakaian pil kontrasepsi kombinasi, dan lama pemakaian pil kontrasepsi kombinasi. Dari 10 variabel bebas yang diteliti, terdapat 4 variabel yang berhubungan dengan kanker payudara, yaitu obesitas, usia melahirkan anak pertama, riwayat pemberian ASI, dan usia *menarche*.

a. Obesitas

Hasil analisis bivariat menunjukkan bahwa salah satu variabel bebas yang berpengaruh terhadap kejadian kanker payudara adalah obesitas. Wanita dengan *Body Mass Index* (BMI) yang besar dapat meningkatkan risiko terkena kanker payudara. Risiko terjadinya kanker payudara pada obesitas akan meningkat karena pada obesitas terjadi peningkatan sintesis estrogen pada timbunan lemak yang berpengaruh terhadap proses proliferasi jaringan payudara.

b. Usia Melahirkan anak pertama

Hasil penelitian yang telah dilakukan menyatakan bahwa usia melahirkan anak pertama di atas 30 tahun dapat meningkatkan risiko perkembangan kanker payudara karena terjadi ketidakseimbangan hormon pada periode diantara usia *menarche* dan usia kehamilan pertama. Jaringan payudara menjadi sangat peka terhadap hal

tersebut, sehingga periode ini merupakan permulaan dari perkembangan kanker payudara.

c. Riwayat pemberian ASI

Hasil penelitian yang telah dilakukan menyatakan bahwa risiko terkena kanker payudara lebih besar pada wanita yang tidak memiliki riwayat menyusui. Kondisi ini dipengaruhi oleh mekanisme hormonal. Wanita menyusui akan mengeluarkan hormon yang disebut prolaktin. Di dalam tubuh, paparan hormon estrogen dan progesteron dalam jumlah yang banyak pada waktu yang lama akan memicu proses proliferasi jaringan termasuk jaringan payudara. Hal ini dapat memicu terjadinya kanker payudara. Keberadaan hormon prolaktin di dalam tubuh akan menekan paparan hormon estrogen dan progesteron yang berlebihan sehingga kadar hormon tersebut di dalam tubuh akan rendah selama masa menyusui. Menurunnya kadar hormon estrogen dan progesteron di dalam darah selama menyusui akan mengurangi pengaruh hormon tersebut terhadap proses proliferasi jaringan payudara.

d. Usia *menarche*

Hasil analisis bivariat menunjukkan bahwa seseorang dengan umur menstruasi yang lebih awal dan *menopause* yang terlambat memiliki risiko terkena kanker payudara yang lebih besar. Hal ini berhubungan dengan lamanya paparan hormon estrogen dan progesteron pada tubuh.

Proses pertumbuhan kanker payudara dimulai dari epitel duktus, lobulus duktus ataupun kelenjar di dekat lobulus dan melakukan invasi ke dalam stroma yang disebut dengan karsinoma invasif. Penyebaran sel kanker terjadi melalui pembuluh getah bening dan tumbuh di kelenjar aksila atau supraklavikula yang ditandai dengan adanya pembengkakan kelenjar getah bening pada ketiak, kemudian sel kanker menyebar ke organ tubuh lainnya melalui pembuluh darah (Luwia, 2003).

Tingkat keganasan kanker payudara dapat dilihat dari stadium atau tahapan perkembangan kanker payudara seperti:

a. Stadium 0

Kanker tidak menyebar atau belum menyebar keluar dari saluran dan kelenjar payudara.

b. Stadium I

Terdapat tumor dengan diameter kurang dari 2 cm dan belum menyebar keluar payudara.

c. Stadium II A

Terdapat tumor dengan diameter 2,5 cm dan belum menyebar ke kelenjar getah bening ketiak atau tumor dengan diameter kurang dari 2 cm tetapi sudah menyebar ke kelenjar getah bening ketiak.

d. Stadium II B

Terdapat tumor dengan diameter lebih dari 5 cm dan belum menyebar ke kelenjar getah bening ketiak atau tumor dengan diameter 2-5 cm tetapi sudah menyebar ke kelenjar getah bening ketiak.

e. Stadium III A

Terdapat tumor dengan diameter kurang dari 5 cm dan sudah menyebar ke kelenjar getah bening ketiak diikuti dengan adanya perlekatan satu sama lain atau perlekatan ke struktur lainnya atau tumor dengan diameter lebih dari 5 cm dan sudah menyebar ke kelenjar getah bening ketiak.

f. Stadium III B

Tumor sudah keluar dari jaringan payudara yaitu ke dalam kulit payudara atau ke dinding dada atau telah menyebar ke kelenjar getah bening di dalam dinding dada dan tulang dada.

g. Stadium IV

Tumor telah menyebar keluar dari daerah payudara dan dinding dada, misalnya tumor menyebar ke hati, tulang, paru-paru, atau organ lainnya.

### 2.2.2 Pengobatan Kanker

Terapi pengobatan modern pada kanker secara umum dibedakan menjadi:

a. Pembedahan (operasi)

Terapi pengobatan kanker dengan pembedahan (operasi) dilakukan apabila kanker masih berada pada stadium awal (stadium I-II). Pada stadium ini, sel kanker masih berada pada satu organ dan belum menyebar ke organ lainnya (belum mengalami metastase). Dokter akan merekomendasikan terapi ini selama kanker yang diderita oleh pasien masih dapat diangkat dengan operasi. Pembedahan yang biasa dilakukan adalah dengan mengangkat benjolan sel kanker atau dengan mengangkat seluruh organ. Kelemahan dari pembedahan (operasi) adalah dokter tidak dapat menggunakan metode ini pada kanker stadium akhir (stadium III-IV), dimana sel kanker sudah menyebar ke organ lainnya (sudah mengalami metastase).

b. Radioterapi (Penyinaran)

Terapi pengobatan kanker dengan radioterapi (penyinaran) dilakukan dengan sinar-X berkekuatan tinggi, sehingga sinar-X dapat merusak DNA sel dan memaksa sel untuk berapoptosis. Terapi ini bersifat lokal atau setempat. Sinar-X yang digunakan hanya membunuh sel kanker dan sel normal yang terpapar oleh sinar-X, sehingga sinar-X tidak menyebabkan kerusakan pada sel normal yang tidak terpapar oleh sinar-X. Kelemahan dari radioterapi (penyinaran) adalah terapi ini menggunakan sinar-X yang bersifat tidak selektif terhadap sel kanker, sehingga sinar-X dapat membunuh sel normal yang terpapar oleh sinar-X. Radioterapi (penyinaran) digunakan sebagai terapi pengobatan paliatif (hanya mengurangi gejala) maupun sebagai terapi pengobatan utama (membunuh sel kanker). Kelebihan dari radioterapi (penyinaran) jika dibandingkan dengan pembedahan adalah terapi ini tidak menimbulkan bekas luka.

### c. Kemoterapi

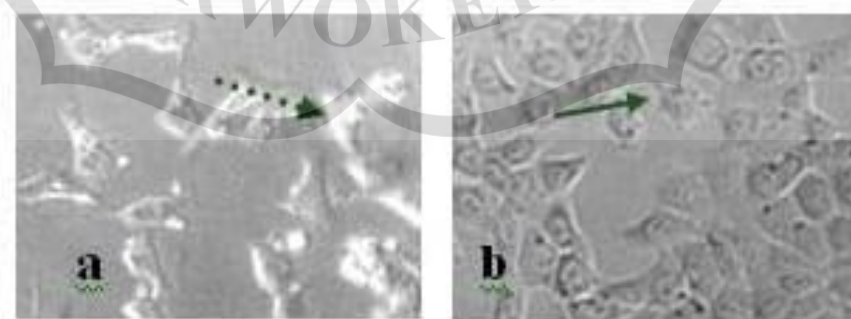
Terapi pengobatan kanker dengan kemoterapi dilakukan apabila kanker yang diderita oleh pasien sudah berada pada stadium akhir (Stadium III-IV). Terapi ini menggunakan obat-obatan kimia (Sitostatika) yang dimasukkan ke dalam tubuh melalui injeksi intravena untuk menghambat pertumbuhan dan membunuh sel kanker. Kelemahan dari kemoterapi adalah terapi ini menggunakan obat-obatan sitostatika, dimana obat-obatan ini memiliki selektivitas yang rendah terhadap sel kanker, sehingga obat-obatan ini dapat menyerang dan membunuh sel normal yang memiliki karakteristik seperti sel kanker (dapat tumbuh dan membelah dengan cepat). Terapi menggunakan obat-obatan sitostatika seperti kemoterapi dapat menyebabkan efek samping. Kemoterapi merupakan terapi utama pada pengobatan kanker yang sudah mengalami metastase (sel kanker sudah menyebar ke organ lainnya). Terapi pengobatan kanker dengan kemoterapi dapat dikombinasikan dengan terapi pembedahan.

#### 2.2.3 Sel T47D

Sel kanker payudara (T47D) merupakan *continuous cell line* yang diisolasi dari jaringan tumor duktal payudara seorang wanita berusia 54 tahun. *Continuous cell line* seperti sel T47D sering digunakan dalam penelitian kanker secara *in vitro* karena mudah dalam penanganannya, memiliki kemampuan replikasi yang tidak terbatas, memiliki homogenitas yang tinggi, serta mudah diganti dengan *frozen stock* jika terjadi kontaminasi (Burdall *et al.*, 2003). Pengamatan morfologi sel kanker payudara (T47D) dilakukan dengan mikroskop cahaya atau mikroskop *inverted* dengan perbesaran 20x.

Morfologi sel T47D yang hidup yaitu sel berbentuk lonjong seperti helaian daun, berwarna terang, dan melekat pada dasar *plate*. Morfologi sel T47D yang mati yaitu sel berbentuk bulat, tampak keruh atau berwarna gelap, dan mengapung pada media (Gaffar *et al.*, 2018). Apabila *plate* digoyangkan secara perlahan, maka sel yang mati akan ikut bergoyang bersama media, sedangkan sel yang hidup tetap melekat pada dasar *plate* dan sel tidak ikut bergoyang bersama media. Sel yang mati berwarna gelap atau tampak keruh karena sel kehilangan sitoplasma.

Sel kanker payudara (T47D) mengekspresikan protein p53 yang termutasi. *Missence mutation* terjadi pada residu 194 (dalam *zinc-binding domain*, L2), sehingga p53 tidak dapat berikatan dengan *response element* pada DNA. Hal ini mengakibatkan berkurangnya bahkan hilangnya kemampuan p53 untuk regulasi *cell cycle*. Sel T47D merupakan sel kanker payudara ER/PR-positif (Schafer *et al.*, 2000). Gambar a, menunjukkan sel T47D tanpa perlakuan atau kontrol sel ketika diinkubasi di dalam inkubator dengan kadar CO<sub>2</sub> sebesar 5% pada suhu 37 °C, sel akan mengalami perubahan secara morfologi. Gambar b, menunjukkan sel T47D setelah diberikan perlakuan dan diinkubasi selama 48 jam di dalam inkubator dengan kadar CO<sub>2</sub> sebesar 5% pada suhu 37 °C, sel akan hidup dan mengalami pembelahan secara tidak terkendali (Gambar 2.1).



**Gambar 2.1. Morfologi sel T47D (CCRC UGM, 2014)**

## 2.2.4 Mekanisme Kematian Sel

### a. Autofagik

Autofagik ditandai oleh adanya vakuolisasi sitoplasma yang masif. Degradasi sitoplasma autofagik membutuhkan pembentukan struktur membran ganda yang disebut autofagosom, yang membawa komponen sitoplasma serta organel dan menyerahkan ke lisosom. Fusi lisosom-autofagosom menyebabkan terjadinya degradasi komponen sitoplasmik oleh hidrolis lisosom. Pada organisme dewasa, autofagik berfungsi sebagai jalur *self-digestion* yang mempromosikan kelangsungan hidup sel di dalam lingkungan yang merugikan dan sebagai mekanisme kontrol kualitas dengan menghilangkan organel yang rusak, metabolit toksik, atau patogen intraseluler (Agostinis *et al.*, 2011).

### b. Nekrosis

Nekrosis secara morfologis ditandai oleh adanya vakuolisasi sitoplasma, pembengkakan dan kerusakan membran plasma yang menghasilkan reaksi inflamasi karena terjadi pelepasan konten seluler dan molekul pro-inflamasi. Nekrosis dianggap sebagai hasil dari *pathological insults* atau disebabkan oleh *a bio-energetic catastrophe*, terjadinya penipisan ATP yang tidak sesuai dengan kelangsungan hidup sel. Biokimia dari nekrosis sebagian besar ditandai oleh tidak adanya aktivasi caspase, pelepasan sitokrom c dan fragmentasi DNA oligonukleosom (Agostinis *et al.*, 2011).

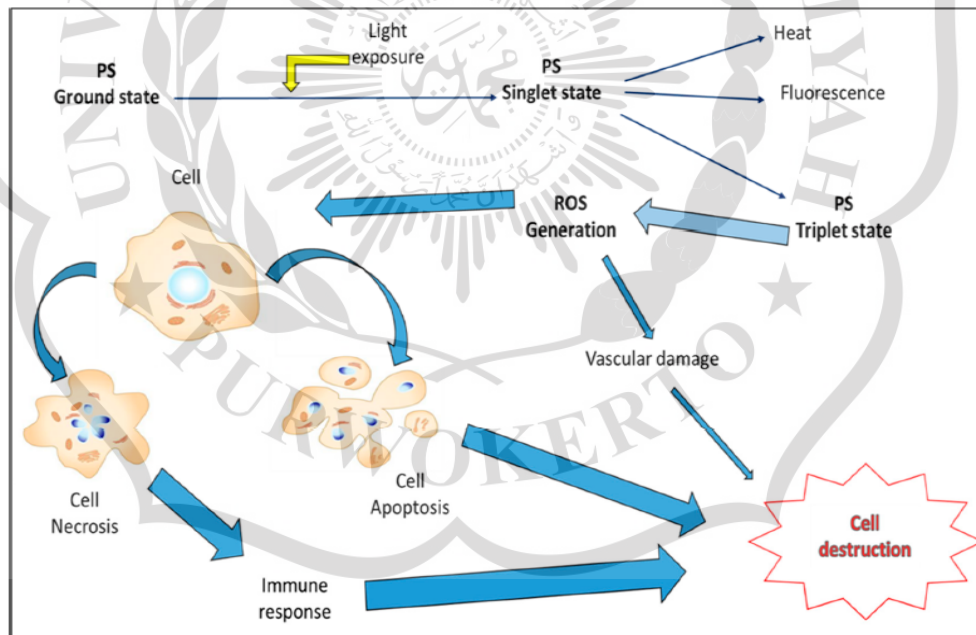
### c. Apoptosis

Apoptosis secara morfologis ditandai dengan adanya kondensasi kromatin, pembelahan kromosom DNA menjadi beberapa fragmen internukleosom, penyusutan sel, *membrane blebbing*, dan pembentukan *apoptotic bodies* tanpa adanya kerusakan membran plasma. Sel-sel apoptosis melepaskan sinyal yang diperlukan untuk membersihkan sisa-sisa sel fagositik. Pada tingkat biokimiawi, apoptosis mensyaratkan adanya aktivasi

*caspases* yang merupakan keluarga dari *cysteine-dependent aspartate-specific proteases* (Agostinis *et al.*, 2011).

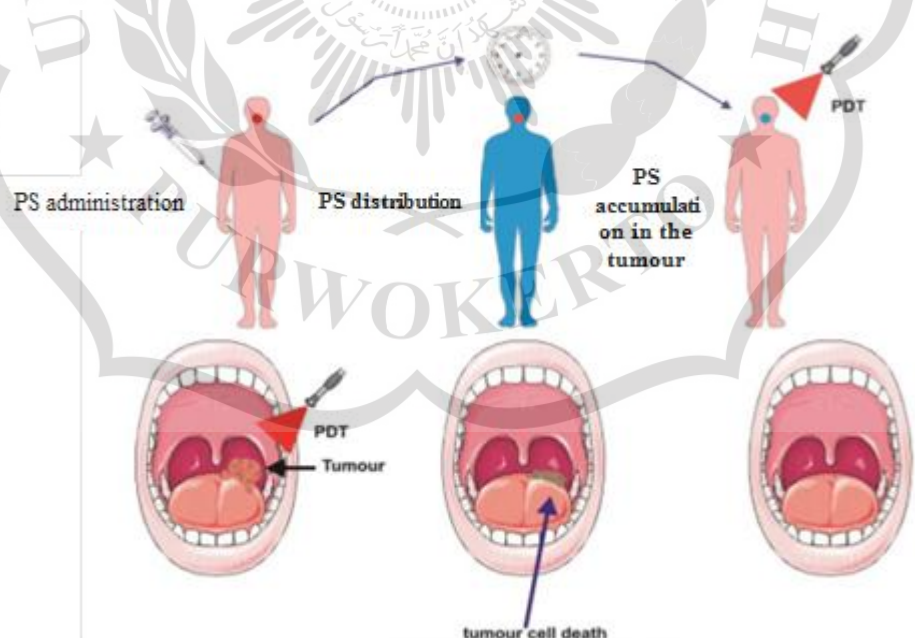
### 2.2.5 Terapi Fotodinamik

PDT merupakan salah satu metode alternatif yang paling umum digunakan untuk pengobatan kanker dan beberapa kondisi non-kanker. PDT bersifat minimal invasif dan telah disetujui secara klinis untuk membunuh sel kanker. Prinsip kerja dari PDT didasarkan pada PS yang dimasukkan ke dalam tubuh, kemudian PS mengalami akumulasi pada sel kanker. PS akan menyerap cahaya pada panjang gelombang yang sesuai dan mengalami eksitasi. Setelah mengalami eksitasi, PS akan bereaksi dengan oksigen dan menghasilkan spesies oksidan molekuler (radikal, oksigen singlet, spesies triplet) di jaringan target, sehingga menyebabkan kematian sel (Dos Santos *et al.*, 2019).



Gambar 2.2. Mekanisme terapi fotodinamik (Mfouo-Tynga dan Abrahamse, 2015)

Pengobatan kanker secara PDT dimulai dengan mengoleskan PS pada kulit atau memasukkan PS ke dalam tubuh. PS yang telah masuk ke dalam tubuh, akan terdistribusi dan menyebar ke seluruh tubuh. PS akan terakumulasi ke dalam sel kanker karena PS bersifat selektif terhadap sel kanker dan memiliki kemampuan untuk melokalisasi lesi neoplastik. Apabila PS diberi paparan sinar pada panjang gelombang yang sesuai, PS akan menyerap cahaya dan mengalami aktivasi. PS pada keadaan dasar akan dikonversikan ke keadaan singlet melalui aktivasi cahaya dengan menggunakan energi yang cukup. PS dalam keadaan singlet dapat kehilangan energi dalam bentuk panas atau fluoresensi, tetapi PS yang ideal dapat mengalami *intersystem crossing* dan berubah menjadi bentuk triplet. PS pada keadaan triplet akan memediasi pembentukan spesies oksigen reaktif (ROS) di dalam sel. ROS yang telah dibentuk kemudian akan menginduksi efek sitotoksik (terutama respon apoptosis dan nekrotik), sehingga menyebabkan kerusakan dan kematian sel (Gambar 2.2) (Mfouo-Tynga dan Abrahamse, 2015).



Gambar 2.3. Prinsip PDT dalam membunuh sel tumor (Agostinis *et al.*, 2011)

PDT dimulai dengan memasukkan PS ke dalam tubuh. PS diberikan secara sistemik atau topikal. Setelah masuk ke dalam tubuh, PS kemudian akan terdistribusi secara sistemik dan terakumulasi secara selektif di dalam sel kanker. PS akan menyerap cahaya dan aktif dengan adanya radiasi cahaya pada panjang gelombang yang sesuai. Reaksi fotokimia akan terjadi dengan adanya oksigen molekuler dan menghasilkan oksigen singlet ( $^1\text{O}_2$ ) yang dapat merusak atau menghancurkan sel kanker. Kerusakan pada makromolekul seluler tidak dapat diperbaiki, sehingga menyebabkan kematian sel kanker melalui mekanisme apoptosis, nekrotik atau autofagik (Gambar 2.3) (Agostinis *et al.*, 2011).

*Light-emitting diode* (LED) merupakan salah satu sumber cahaya yang biasa digunakan dalam PDT. LED memiliki rentang spektrum absorpsi porfirin tipe PS. LED merupakan suatu semikonduktor kompleks yang dapat mengkonversi energi listrik menjadi cahaya. LED memiliki kelebihan yaitu LED hanya menghasilkan sejumlah kecil panas dalam cahaya yang ditimbulkan (Schubert, 2006). Beberapa penelitian menyebutkan bahwa reaksi pada cahaya LED bergantung pada fotoaktivasi dan aktivitas fotobiomodulasi seluler oleh foton yang kemudian diubah menjadi energi sel. Reaksi ini bersifat termal sehingga aman terhadap kulit. Kelebihan LED dibandingkan sumber cahaya lain untuk proses fototerapi adalah LED hanya menghasilkan sejumlah kecil panas dalam cahaya yang ditimbulkan, sehingga tidak menimbulkan kerusakan pada lapisan dermis (Karu, 2003). LED menghasilkan cahaya dengan berbagai macam warna pada panjang gelombang tertentu. Warna cahaya yang diemisikan oleh LED bergantung pada komposisi dan kondisi dari material semikonduktor yang digunakan, baik infrared, *visible*, atau ultraviolet (Schubert, 2006).

LED dapat digunakan untuk mengaktifkan PS seperti *photofrin* dan beberapa PS generasi kedua, diantaranya : *bacteriochlorins*, *phorphyrins* tersubstitusi, *chlorins*, *naphthalocyanines*, *purpurins*, *phthalocyanines*, dan derivat *benzoporphyrin*. Keuntungan dari PS generasi kedua dibandingkan *photofrin* adalah PS generasi kedua dapat menyerap cahaya pada panjang gelombang yang lebih besar, dapat menghasilkan singlet oksigen yang lebih besar, dan dapat mengurangi fototoksisitas kulit. Pita penyerapan derivat *benzoporphyrin* dan beberapa Pc berada pada panjang gelombang 690 nm dan 675 nm. LED menghasilkan spektrum absorpsi pada daerah merah dengan panjang gelombang maksimal 677 nm (*bandwidth* 25 nm). LED secara potensial dapat menjadi sumber sinar yang lebih efisien pada PS generasi kedua terutama Pc. Penggunaan LED sebagai sumber cahaya pada PDT jauh lebih ekonomis dibandingkan sinar laser karena LED memiliki harga yang sangat murah (Schmidt, M.H. *et al.*, 1996).

Salah satu syarat dari PS yang ideal adalah memiliki toksisitas yang rendah dan tidak aktif dalam keadaan tanpa cahaya, sebaliknya PS akan aktif dan memiliki aktivitas antikanker yang tinggi dengan adanya cahaya pada panjang gelombang yang sesuai. Tingkat toksisitas dan potensi dari suatu PS dapat diketahui dengan melakukan pengukuran nilai *viabilitas* sel. *Viabilitas* sel adalah kemampuan sel untuk bisa hidup atau bertahan dalam suatu kondisi lingkungan. Parameter yang digunakan untuk mengukur nilai *viabilitas* sel adalah nilai IC<sub>50</sub>. Nilai IC<sub>50</sub> (*Inhibitory Concentration 50%*) merupakan nilai yang dapat menunjukkan tingkat konsentrasi sampel yang mampu menghasilkan hambatan proliferasi sel sebesar 50% dari total populasi sel. Nilai IC<sub>50</sub> juga dapat digunakan untuk mengetahui tingkat toksisitas dari suatu senyawa terhadap sel dan dapat menunjukkan potensi dari suatu senyawa sebagai agen sitotoksik. Semakin besar nilai IC<sub>50</sub> dari suatu senyawa menunjukkan semakin tidak toksik senyawa tersebut terhadap sel dan semakin kecil nilai IC<sub>50</sub> dari suatu senyawa menunjukkan semakin toksik senyawa tersebut terhadap sel. Metode yang biasa

digunakan untuk mengukur nilai *viabilitas* sel adalah metode MTT *assay* dan metode SRB *assay* (Itharat dan Ooraikul, 2007).

Metode MTT *assay* dan SRB *assay* didasarkan pada prinsip kolorimetri. Metode MTT *assay* didasarkan pada reduksi metabolik senyawa 3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT). Pada metode MTT *assay* dilakukan pengukuran kristal formazan yang terbentuk. Kristal formazan merupakan kristal berwarna ungu yang bersifat tidak larut dalam air tetapi larut dalam SDS 10%. Kristal formazan terbentuk melalui reaksi antara garam MTT dengan sistem reduktase suksinat tetrazolium yang terdapat dalam mitokondria sel hidup. Garam MTT berwarna kuning yang larut dalam air akan diubah oleh enzim dehidrogenase di dalam mitokondria sel hidup menjadi bentuk formazan berwarna ungu yang tidak larut dalam air. Garam tetrazolium dapat diubah menjadi bentuk formazan karena enzim dehidrogenase, aktif memetabolisme garam tetrazolium, sehingga menyebabkan terjadinya pemutusan cincin tetrazolium oleh enzim dehidrogenase (Haryoto *et al.*, 2013). Kristal formazan yang terbentuk kemudian dikuantifikasi menggunakan ELISA *reader*. Intensitas warna ungu yang diperoleh berbanding lurus dengan jumlah kristal formazan yang terbentuk. Jumlah kristal formazan yang terbentuk berbanding lurus dengan jumlah sel yang hidup. Semakin tinggi intensitas warna ungu yang terbentuk maka semakin tinggi absorbansi sel yang dihasilkan. Semakin tinggi absorbansi sel yang dihasilkan menunjukkan semakin tinggi jumlah sel hidup yang terdapat di dalam kultur. Metode MTT *assay* bersifat spesifik untuk mengukur sel yang hidup.

Metode SRB *assay* menggunakan *protein-binding dye sulforhodamine B* (SRB). Metode SRB *assay* didasarkan atas pembentukan *aminoxantin* yang berwarna merah muda. *Aminoxantin* merupakan protein anionik berwarna yang berisi dua gugus sulfonik yang terikat ke residu asam amino dalam sel dengan kondisi lingkungan sedikit asam. Protein yang terikat tersebut dilarutkan oleh basa lemah

sebelum diukur secara spektrofotometri. Pengujian secara kolorimetri dilakukan melalui pengukuran indeks sensitifitas dari jumlah protein seluler untuk memperkirakan jumlah sel secara langsung. Jumlah protein seluler tersebut secara linier berhubungan dengan kepadatan sel (Itharat dan Ooraikul, 2007). Metode SRB *assay* digunakan untuk menghitung jumlah sel secara keseluruhan. Metode ini tidak membedakan antara sel yang hidup dan sel yang mati.

*Enzim Linked Immunosorbent Assay* (ELISA) merupakan suatu metode yang secara umum digunakan untuk mendeteksi keberadaan suatu antibodi atau antigen dalam sampel. ELISA menggunakan suatu enzim spesifik untuk menandai adanya ikatan antara antigen dan antibodi yang berpasangan. Ikatan antara antigen dan antibodi kemudian dideteksi melalui penambahan substrat dan dapat dilihat secara visual melalui perubahan warna (Crowther, 1995). Terdapat 3 jenis ELISA yaitu *direct* ELISA, *indirect* ELISA, dan *sandwich* ELISA.

Pada *direct* ELISA, antigen diimmobilisasi di dalam sumur pelat ELISA. Antigen kemudian dideteksi oleh antibodi yang langsung terkonjugasi dengan enzim seperti HRP. Pada *indirect* ELISA, antigen diadsorpsi ke dalam sumur pelat ELISA. Deteksi pada *indirect* ELISA menggunakan proses dua langkah. Pertama, antibodi primer tanpa label mengikat antigen spesifik. Kedua, antibodi sekunder yang terkonjugasi enzim berikatan dengan spesies inang dari antibodi primer. *Sandwich* ELISA menggunakan pasangan antibodi yang cocok (antibodi penangkap dan antibodi pendeteksi). Oleh karena itu, setiap antibodi spesifik untuk wilayah atau epitop antigen yang berbeda dan tidak tumpang tindih. Pasangan antibodi yang cocok harus diuji secara khusus dalam ELISA *sandwich* untuk memastikan bahwa pasangan antibodi tersebut dapat mendeteksi epitop yang berbeda, sehingga didapatkan hasil yang akurat. Antibodi penangkap mengikat antigen yang kemudian dapat dideteksi dalam *direct* ELISA atau *indirect* ELISA (Bio-Rad, 2017).

Uji ELISA menghasilkan tiga jenis *output* data, seperti:

a. Kuantitatif

Data ELISA dapat diinterpretasikan sebagai perbandingan dengan kurva standar (dengan melakukan pengenceran serial dari antigen yang telah diketahui dan dimurnikan). Hal ini dilakukan untuk menghitung konsentrasi antigen dalam berbagai sampel secara tepat (Bio-Rad, 2017).

b. Kualitatif

ELISA dapat digunakan untuk mengetahui ada atau tidaknya suatu antigen di dalam sampel. Hasil tersebut kemudian dibandingkan dengan suatu sumur kosong yang tidak mengandung antigen atau dibandingkan dengan kontrol antigen (Bio-Rad, 2017).

c. Semi-kuantitatif

ELISA dapat digunakan untuk membandingkan tingkat relatif antigen dalam sampel uji, karena intensitas sinyal akan bervariasi secara langsung dengan konsentrasi antigen (Bio-Rad, 2017).

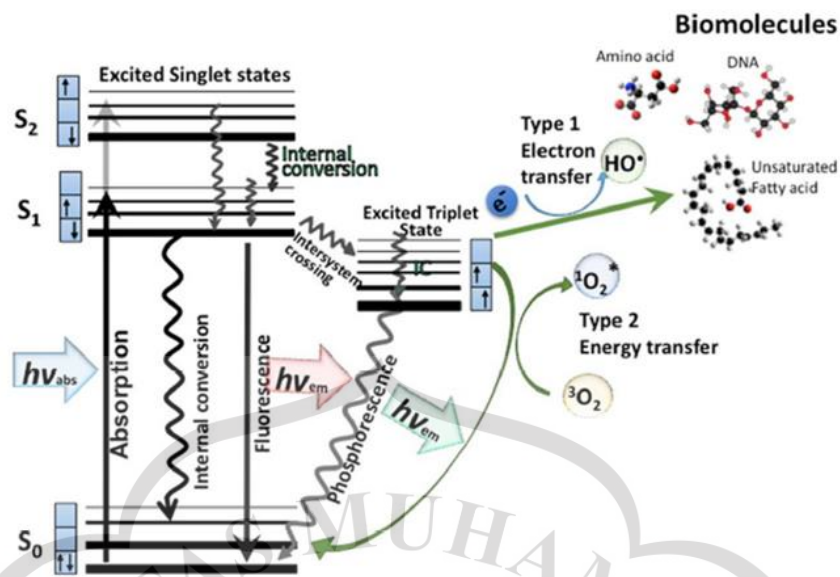
Uji ELISA biasanya banyak dilakukan untuk monitoring hasil vaksinasi. Agustini dan Wisindie (2015) melakukan penelitian berupa uji banding KIT ELISA untuk mendeteksi adanya antibodi jembrana. Salah satu upaya pencegahan penyakit jembrana adalah dengan vaksinasi. Untuk mengetahui tingkat keberhasilan vaksinasi, dilakukan pengambilan sampel serum setelah vaksinasi dan selanjutnya akan dilakukan uji ELISA. Uji ELISA dilakukan untuk mendeteksi adanya antibodi jembrana dengan menggunakan antigen sukrosa N90. Antigen sukrosa N90 dibuat dari virus jembrana yang dalam proses produksinya membutuhkan hewan donor (sapi Bali) dan *ultracentrifuge*.

### 2.2.6 Fotosensitizer

PS merupakan suatu kelompok senyawa yang biasa digunakan dalam PDT untuk pengobatan kanker dan beberapa kondisi non-kanker. PS memiliki selektifitas yang tinggi pada sel kanker. PS yang telah masuk dan terdistribusi ke seluruh tubuh, akan terakumulasi pada sel kanker atau jaringan target. PS kemudian akan mengalami fotoaktivasi apabila PS diberi paparan cahaya pada panjang gelombang yang sesuai. Ada beberapa jenis PS yang digunakan dalam PDT. PS idealnya merupakan senyawa murni tunggal.

PS yang dapat digunakan dalam PDT harus memiliki karakteristik tertentu. Karakteristik dari PS yang ideal adalah PS harus dapat menyerap cahaya pada panjang gelombang 600-850 nm, memiliki kemampuan penetrasi cahaya ke dalam jaringan yang lebih besar, memiliki toksisitas yang rendah dalam keadaan gelap, memiliki aktivitas antikanker yang tinggi dengan adanya cahaya pada panjang gelombang yang sesuai, dapat menghasilkan oksigen singlet dengan jumlah yang cukup, dapat dikeluarkan dari tubuh dengan cepat, serta memiliki efek samping yang rendah terhadap sel normal (Maiya, 2000).

Pada panjang gelombang kurang dari 600 nm terjadi penyerapan cahaya oleh kromofor endogen misalnya hemoglobin dan melanin (kromofor endogen utama pada kulit). Hemoglobin memiliki serapan kuat pada panjang gelombang 418, 542, dan 577 nm. Melanin memiliki serapan melebar pada panjang gelombang 300-500 nm. Pada panjang gelombang lebih dari 850 nm (850-900 nm), penyerapan foton cahaya menjadi tidak maksimal, sehingga foton tidak memiliki energi yang cukup untuk menjalani reaksi fotokimia. Pada panjang gelombang lebih dari 1000 nm, absorpsi oleh air menjadi lebih dominan. Penyerapan cahaya oleh PS yang ideal terjadi pada panjang gelombang 600-850 nm pada daerah merah karena cahaya akan berpenetrasi ke jaringan yang lebih dalam. Penyerapan cahaya dan penetrasi ke dalam jaringan disebabkan oleh terjadinya penurunan absorbansi oleh jaringan dan penurunan *light scattering* (Maiya, 2000).



Gambar 2.4. Mekanisme fotofisika dan fotokimia senyawa fotosensitizer (Abrahamse dan Hamblin, 2016)

Mekanisme fotofisika dan fotokimia dari PS dimulai dengan memasukkan PS ke dalam tubuh, kemudian PS akan terdistribusi dan menyebar ke seluruh tubuh. PS akan mengenali dan terakumulasi pada sel kanker. PS pada keadaan dasar, berada pada keadaan singlet dan memiliki dua elektron dengan putaran berlawanan. PS jika diberi paparan cahaya pada panjang gelombang yang sesuai, akan menyerap foton cahaya ( $h\nu$ ) dan menyebabkan terjadinya pergerakan (eksitasi) satu elektron dari keadaan singlet berenergi rendah (tidak tereksitasi) ke keadaan singlet berenergi tinggi (tereksitasi). PS pada keadaan singlet tereksitasi dapat mengalami *intersystem crossing* untuk membentuk keadaan triplet tereksitasi. *Intersystem crossing* melibatkan perubahan putaran pada elektron berenergi tinggi dalam konformasi paralel yang mengarah ke keadaan triplet tereksitasi. PS pada keadaan singlet tereksitasi bersifat sangat tidak stabil, sehingga PS dapat meluruh dan kembali ke *ground state* dengan melepaskan energi. Pelepasan energi terjadi dengan memancarkan foton (fluoresensi) atau dengan konversi internal (peluruhan non-radiasi). PS dalam keadaan triplet tereksitasi

dapat meluruh dan kembali ke *ground state* dengan memancarkan foton berpendar (fosforesensi). PS dalam keadaan triplet tereksitasi dapat bereaksi dengan oksigen molekuler, superoksida dan radikal hidroksil yang terbentuk dalam reaksi tipe I, serta PS dapat bereaksi dengan oksigen singlet yang terbentuk dalam reaksi tipe II, sehingga menyebabkan terbentuknya ROS. ROS yang telah terbentuk akan merusak sebagian besar jenis biomolekul seperti asam amino, lipid, dan asam nukleat (Gambar 2.4) (Abrahamse dan Hamblin, 2016).

Mekanisme terkait distribusi dan akumulasi PS pada sel tumor atau sel kanker belum diketahui sepenuhnya, namun sifat-sifat dari jaringan tumor atau kanker diduga merupakan salah satu faktor yang dapat mempengaruhi akumulasi PS. Beberapa faktor seperti adanya peningkatan jumlah reseptor protein berdensitas rendah (*low-density protein receptors*), keberadaan makrofag, dan terjadinya penurunan nilai pH diduga ikut berperan dalam menentukan selektivitas PS pada sel kanker. Beberapa karakteristik dari jaringan tumor seperti adanya struktur yang abnormal dengan ruang antar sel yang besar, memiliki sistem sirkulasi dengan permeabilitas tinggi, terdapat sejumlah besar kolagen yang telah disintesis (mampu mengikat porfirin), serta sejumlah besar lemak (memiliki afinitas tinggi terhadap molekul lipofilik), diduga ikut mempengaruhi distribusi PS yang cenderung terakumulasi pada sel tumor atau sel kanker (Dougherty *et al.*, 1998).

Suatu studi menyebutkan bahwa sel kanker dapat mengakumulasi senyawa PS karena adanya mutasi yang terjadi pada gen yang bertanggung jawab pada pengangkutan PS keluar dari sel tumor. Kelompok gen ABC-*transporter* seperti *bcrp1/abcg2* dan *abca3* merupakan salah satu kelompok gen yang bertanggung jawab dalam sistem transpor PS. Sel kanker yang cenderung mudah mengeluarkan molekul obat-obatan yang bersifat sitotoksik yaitu sel yang memiliki ekspresi gen *abcg2* dan *abca3* dalam jumlah tinggi (Hirschmann-Jax *et al.*, 2004). Penelitian lain menunjukkan bahwa sel kanker yang tidak memiliki gen *bcrp1/abcg2* mudah mengakumulasi PS. PS merupakan

senyawa turunan klorofil yang menimbulkan efek fototoksik (dapat memicu kematian sel dengan adanya cahaya) (Jonker *et al.*, 2002). Apabila terjadi mutasi yang menghambat ekspresi kelompok gen tersebut, maka PS dapat masuk ke dalam sel, namun PS tidak dapat dieliminasi keluar dari sel, sehingga PS akan terakumulasi dalam sel.

Saat PS diinjeksikan ke dalam tubuh, PS akan terdistribusi ke seluruh tubuh dan diabsorpsi oleh sel normal maupun sel kanker. Jaringan normal memiliki sistem pembuluh darah dengan dinding yang rapat dan kuat dengan ukuran pori sekitar 50 nm. Pada jaringan normal juga terdapat sistem limfatik. Jaringan tumor memiliki sistem pembuluh darah dengan pori dinding yang lebih besar (sekitar 100 nm). Pada jaringan tumor tidak terdapat sistem limfatik. Sistem limfatik dapat mengeliminasi senyawa lipofilik dan polimerik yang bersifat sitotoksik terhadap sel, sehingga sel normal memiliki kemampuan yang lebih baik dalam mengeliminasi PS. Sel kanker tidak memiliki sistem limfatik, sehingga sel kanker tidak dapat mengeliminasi PS dengan baik (Indrawati *et al.*, 2010).

PS generasi pertama seperti HpD dan *photofrin* merupakan suatu campuran kompleks dari struktur monomerik, dimerik, dan oligomerik. Senyawa ini memiliki beberapa kelemahan, seperti intensitas penyerapan cahaya yang rendah ( $\epsilon_{\max}$  pada 630 nm). Semakin tinggi nilai  $\epsilon_{\max}$  maka semakin besar efek potensial fotodinamik yang dihasilkan, sebaliknya semakin rendah nilai  $\epsilon_{\max}$  maka semakin kecil efek potensial fotodinamik yang dihasilkan. Pada  $\epsilon_{\max}$  630 nm atau kurang dari 630 nm, kemampuan penetrasi cahaya ke dalam jaringan menjadi lebih kecil yaitu sebesar 2-3 mm, sehingga PS hanya terlokalisasi di permukaan jaringan. PS yang hanya terlokalisasi di permukaan jaringan menjadi kurang efektif dalam membunuh sel kanker (Ormond dan Freeman, 2013). PS generasi pertama memiliki efek samping yaitu dapat menyebabkan fototoksitas kulit karena senyawa ini akan disimpan di jaringan kulit hingga sepuluh minggu

setelah injeksi, sehingga pasien harus menghindari sinar matahari selama beberapa minggu (Maiya, 2000).

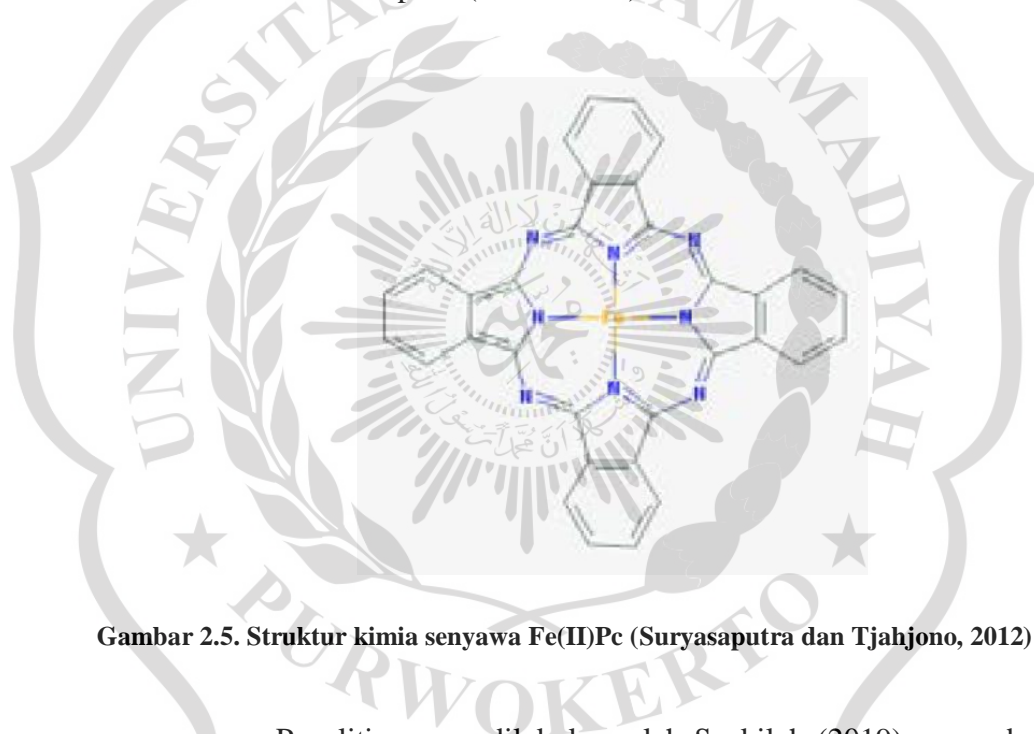
Kelemahan lainnya yang dimiliki oleh PS generasi pertama yaitu pita serapan utama PS generasi pertama tidak berada di daerah merah ( $\lambda$  600-800 nm), sehingga senyawa ini tidak dapat berpenetrasi ke jaringan yang lebih dalam dan hanya terlokalisasi di permukaan jaringan. PS yang hanya terlokalisasi di permukaan jaringan dapat menyebabkan terjadinya fototoksitas kulit (Jinling *et al.*, 2001). PS generasi pertama memiliki kelemahan, sehingga digunakan PS generasi kedua. Salah satu PS generasi kedua yang biasa digunakan dalam PDT adalah *phthalocyanine*.

#### 2.2.7 *Phthalocyanine* dan Fe (II) *Phthalocyanine*

Pc merupakan salah satu PS generasi kedua. Pc merupakan PS yang memiliki struktur makrosiklik dengan gugus isoindol dan atom nitrogen pada posisi meso, bersifat fleksibel dan stabil. Pc memiliki panjang gelombang maksimal 670-700 nm dan aktif pada daerah merah. Panjang gelombang maksimal Pc yang lebih besar memungkinkan bagi Pc untuk berpenetrasi ke jaringan yang lebih dalam, sehingga Pc dapat menghasilkan efek fotodinamik yang lebih besar dalam membunuh sel kanker (Ormond dan Freeman, 2013). Pc memiliki fototoksitas yang rendah terhadap kulit karena Pc tidak mengalami absorpsi pada panjang gelombang *visible* (400-500 nm) (Jinling *et al.*, 2001). Pc dapat dikombinasikan dengan senyawa logam menjadi kompleks senyawa *metallo-phthalocyanine* (logam-*phthalocyanine*).

Kombinasi Pc dengan logam dapat menyebabkan terjadinya transisi logam dan memungkinkan terjadinya *intersystem crossing* yang lebih besar. *Intersystem crossing* yang lebih besar dapat menyebabkan terjadinya perubahan pada keadaan triplet tereksitasi yang lebih lama, sehingga jumlah oksigen singlet yang dihasilkan menjadi lebih besar. Jumlah oksigen singlet yang lebih besar dapat

menghasilkan efek fotodinamik yang lebih besar dalam membunuh sel kanker (Frackowiak *et al.*, 2001). Kompleks Pc dengan logam dapat meningkatkan kelarutan Pc dalam air. Salah satu senyawa logam yang biasa dikombinasikan dengan Pc adalah besi (II) atau Fe (II). Kombinasi dari kedua senyawa tersebut menghasilkan kompleks senyawa Fe(II)Pc. Fe(II)Pc merupakan salah satu senyawa *metallo-phthalocyanine* yang digunakan sebagai PS dalam PDT. Fe(II)Pc merupakan senyawa turunan dari Pc yang memiliki struktur makrosiklik dengan gugus isoindol dan atom nitrogen pada posisi meso. Senyawa ini mengandung logam Fe (II) pada inti cincin makrosiklik tetrapireol (Gambar 2.5).



**Gambar 2.5. Struktur kimia senyawa Fe(II)Pc (Suryasaputra dan Tjahjono, 2012)**

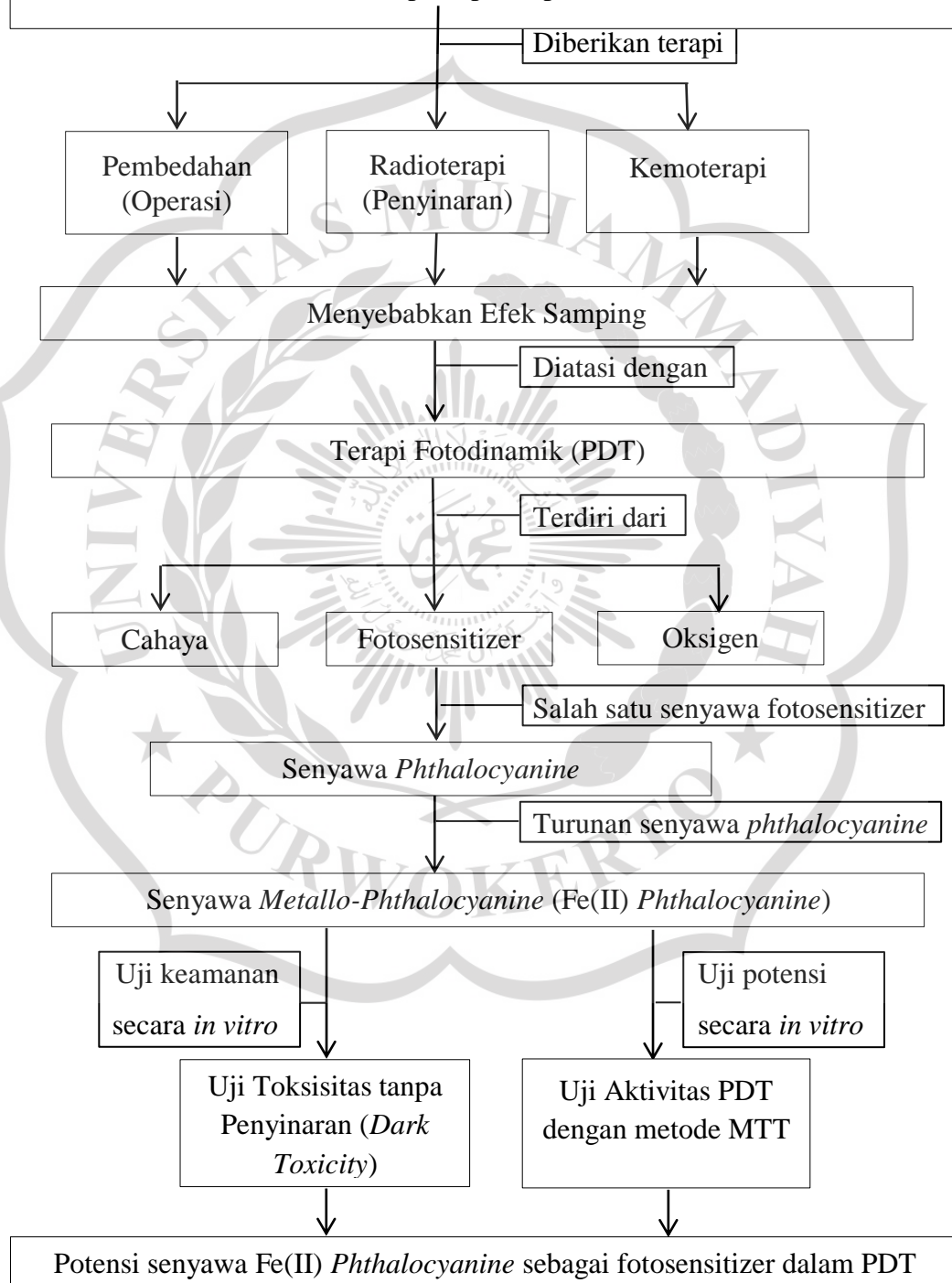
Penelitian yang dilakukan oleh Syakilah (2019), menyebutkan bahwa hasil prediksi log P (koefisien partisi) dari Fe(II)Pc adalah 3,85. Hasil tersebut menunjukkan bahwa Fe(II)Pc termasuk senyawa yang bersifat lipofil, sehingga memungkinkan bagi Fe(II)Pc untuk terlokalisasi di dalam membran intraseluler dari sel kanker. Fe(II)Pc memiliki panjang gelombang sebesar 661 nm dan berada pada daerah merah pada cahaya tampak. Hal ini menunjukkan bahwa Fe(II)Pc dapat menembus jaringan subkutan lemak yang berada di kedalaman 4-5 mm dari permukaan kulit.

Penelitian yang dilakukan oleh Staicu *et al.* (2013), menyebutkan bahwa Fe(II)Pc yang dilarutkan dengan pelarut DMSO memiliki nilai hidup oksigen singlet sebesar 6,0  $\mu$ s. Nilai hidup oksigen singlet ditentukan oleh jenis dan karakteristik fisika dan kimia dari suatu senyawa. Beberapa senyawa Pc memiliki nilai hidup oksigen singlet yang berbeda. Perbedaan tersebut sangat tergantung pada karakteristik dari logam diamagnetik atau logam paramagnetik yang digunakan untuk membentuk kompleks logam-*phthalocyanine*.

Penelitian yang dilakukan oleh Silva *et al.* (2017), menyebutkan bahwa Fe(II)Pc memiliki panjang gelombang sebesar 661 nm dalam pelarut DMSO, sedangkan dalam pelarut THF, Fe(II)Pc memiliki panjang gelombang sebesar 708 nm. Panjang gelombang Fe(II)Pc menunjukkan bahwa Fe(II)Pc berada pada daerah merah pada cahaya tampak. Fe(II)Pc memiliki nilai hidup fluoresensi sebesar 2,28 ns dalam pelarut DMSO, sedangkan dalam pelarut THF, Fe(II)Pc memiliki nilai hidup fluoresensi sebesar 2,90 ns.

### 2.3 Kerangka Konsep

Kanker payudara merupakan salah satu jenis kanker yang paling banyak diderita oleh perempuan di dunia. Berdasarkan data dari Globocan 2018 International Agency for Research on Cancer (IARC), pada tahun 2018 didapatkan data bahwa kanker payudara memiliki prevalensi sebesar 2.088.849 kasus (24,2%) pada perempuan di dunia dan memiliki prevalensi sebesar 58.256 kasus (30,9%) pada perempuan di Indonesia (WHO, 2019).



## 2.4 Hipotesis

Ormond dan Freeman (2013) menyebutkan bahwa Pc memiliki daya serap yang tinggi pada panjang gelombang 670-700 nm, sehingga Pc dapat berpenetrasi ke jaringan yang lebih dalam. Frackowiak *et al.* (2001) menyebutkan bahwa Pc membutuhkan formasi kompleks dengan logam untuk menghasilkan peningkatan *intersystem crossing*, sehingga jumlah oksigen singlet yang dihasilkan lebih besar. Dengan demikian, dapat ditarik hipotesis bahwa penambahan logam pada Pc seperti Fe(II)Pc dapat menghasilkan peningkatan *intersystem crossing*, sehingga jumlah oksigen singlet yang dihasilkan lebih besar. Jumlah oksigen singlet yang lebih besar dapat menghasilkan efek fotodinamik yang lebih besar.

