

Potensi Blue Light Emitting Diode (LED) untuk Fotoinaktivasi Bakteri *Staphylococcus aureus* dengan Porfirin Endogen

(The Potency of Blue Light Emitting Diode (LED) for Photoinactivation of *Staphylococcus aureus* Bacteria with Endogeneous Porphyrin)

Suryani Dyah Astuti*, Ni'matuzahroh**, Muhammad Zainuddin***, Suhariningsih*

ABSTRACT

Photodynamic Inactivation (PDI) represents a method for bacteria inactivation by using combination of endogenous porphyrin and light photon. The purpose of this study were to determine the instrument performance of LED light source that had been assembled and to recognize the potency of LED irradiating energy dose for photoinactivation of *Staphylococcus aureus* bacteria ATCC 6538P with endogenous porphyrin. Performance measurement of LED instrument showed that blue LED had emission peak of 430 nm and red 629 nm with 65 nm and 30 nm bandwidth. The analysis of LED irradiating energy dose by anova indicated that interaction of power and irradiating time of blue LED 430 nm decreased the percentage of *Staphylococcus aureus* colonies. With optimal irradiating of 75 mW/cm² power density and 30 minute time of irradiating (energy density 135 J/cm²), it yielded the percentage decrease of *Staphylococcus aureus* colonies as many as 75%. Hence, the blue LED instrument has a high potential for photoinactivation to *Staphylococcus aureus* bacteria.

Key words: photodynamic inactivation, LED, endogenous porphyrin photosensitizer, *Staphylococcus aureus*

PENDAHULUAN

Bakteri *Staphylococcus aureus* hidup secara komensal pada kulit, saluran hidung atau tenggorokan manusia. Pada kondisi abnormal, bakteri ini dapat menyebabkan sejumlah penyakit dari penyakit kulit ringan seperti infeksi kulit, *acne vulgaris*, cellulitis folliculitis sampai penyakit berat seperti pneumonia, meningitis, osteomyelitis endocarditis, toxic shock syndrome, dan septicemia (Jawetz *et al.*, 2000). Infeksi *Staphylococcus aureus* dapat juga disebabkan oleh kontaminasi langsung pada luka, misalnya pada infeksi luka pasca bedah atau infeksi setelah trauma (Jawetz *et al.*, 2000).

Secara alamiah beberapa bakteri mengakumulasi senyawa porfirin sebagai molekul fotosensitizer yang bersifat peka terhadap cahaya. Penelitian Papageorgiou (2000) menunjukkan penyinaran cahaya dengan spektrum panjang gelombang sesuai spektrum serap porfirin fotosensitizer dan dosis energi penyinaran yang tepat menyebabkan fotoinaktivasi sel bakteri. Mekanisme fotoinaktivasi melibatkan proses fotosensitisasi, yaitu proses penyerapan

cahaya oleh porfirin bakteri yang mengaktifasi terjadinya reaksi kimia menghasilkan berbagai spesies oksigen reaktif (Grossweiner, 2005). Fotosensitisasi bergantung pada jenis dan kuantitas porfirin (Nitzan *et al.*, 2004) dan kesesuaian spektrum cahaya dengan spektrum serap fotosensitizer (Papageorgiou *et al.*, 2000).

Fotoinaktivasi adalah penghambatan aktivitas metabolisme sel karena kerusakan membran sitoplasmik akibat peroksidasi oleh oksigen reaktif pada lipid dan protein mengakibatkan lisis sel atau inaktivasi sistem transport membran dan sistem enzim transport membran pada sel bakteri tersebut (Hamblin & Hasan, 2003). Hasil penelitian Nitzan & Ashkenazi (2001) juga melaporkan adanya gangguan sintesis dinding sel pada fotoinaktivasi bakteri serta munculnya struktur multilamellar di dekat septum pemisah sel seiring hilangnya ion-ion kalium dari sel bakteri Gram negatif. Maclean *et al.* (2008) melaporkan peran oksigen pada fotoinaktivasi *Staphylococcus aureus*.

Setiap bakteri mengakumulasi jenis porfirin yang spesifik (Ramberg & Johnsson, 2004). Sintesis porfirin

* Departemen Fisika Fakultas Sains dan Teknologi Universitas Airlangga

** Departemen Biologi Fakultas Sains dan Teknologi Universitas Airlangga

*** Fakultas Farmasi Universitas Airlangga

bakteri terjadi pada sitoplasma dengan prekursor alami asam d-aminolevulinat (dALA) (Grossweiner, 2005) yang menghasilkan berbagai tipe porfirin yaitu, coproporfirin III, uroporfirin III dan protoporfirin IX. Nitzan *et al.*, 2004 melaporkan bahwa strain bakteri Gram positif Staphylococci menghasilkan jenis coproporfirin III (68–75%). Grinholc *et al.* (2008) melaporkan peran konsentrasi porfirin pada fotoinaktivasi bakteri *Staphylococcus aureus* resisten *methicillin* (40 MRSA) dan sensitif *methicillin* (40 MSSA) dengan penambahan eksogen fotosensitizer ALA dan protoporfirin IX dengan penyinaran lampu biostimul 624 nm dosis 0,2 J/cm² tiap menit. Lipovsky *et al.* (2009) meneliti fotoinaktivasi pada strain 101 (*sensitif methicilin*) dan strain 500 (resisten *methicillin*) dengan lampu halogen 400–800 nm dosis energi 18–180 J/cm² dengan intensitas 300 mW/cm² dan waktu penyinaran 1, 5, dan 10 menit.

Beberapa literatur di atas menunjukkan bahwa sinar tampak, terutama sinar biru pada spektrum 400–470 nm dapat menyebabkan fotoinaktivasi pada beberapa bakteri melalui fotostimulasi pada porfirin endogen intraseluler. Kemampuan porfirin dalam menyerap cahaya adalah bersifat spesifik. Hasil penelitian Papageorgiou *et al.* (2000) menunjukkan bahwa spektrum serap porfirin tipe fotosensitizer berada pada panjang gelombang 400 nm sampai 650 nm. Secara teoritis porfirin memiliki 2 intensitas spesifik, yaitu *Soret Band* yang berada pada panjang gelombang 401, 6983 nm (jangkauan UV) dan *Q Band* yang berada pada panjang gelombang 271,84 nm, 631,2591 nm, 719,8765 nm, dan 929,9591 nm (Makarska & Radzki, 2002).

Sumber cahaya yang berada pada rentang spektrum serap porfirin fotosensitizer antara lain adalah *Light-emitting diode* (LED). LED merupakan piranti semikonduktor yang efektif mengkonversi energi listrik menjadi cahaya dengan lebar spektral 10 nm yang dapat dimodulasi pada kecepatan tinggi (Ross, 1979). LED menghasilkan cahaya dengan berbagai warna. Warna cahaya yang diemisikan oleh LED bergantung pada komposisi dan kondisi dari material semikonduktor yang digunakan, baik infra merah, cahaya tampak maupun ultraviolet (Schubert, 2006). LED memiliki kelebihan antara lain menghasilkan sedikit panas sehingga tidak menimbulkan kerusakan pada lapisan dermis (Karu, 2003), dengan harga bahan yang relatif murah dan lebih sederhana dalam perakitan. Kelebihan dari LED ini selanjutnya dimanfaatkan untuk fotoinaktivasi pada mikroba, karena temperatur merupakan salah satu faktor penting yang memengaruhi pertumbuhan, multiplikasi dan kelangsungan hidup mikroorganisme.

Penelitian fotoinaktivasi mikroba secara *in vitro* menggunakan sumber cahaya LED antara lain dilakukan oleh Johansen *et al.* (2003) yang melaporkan keberhasilan fotoinaktivasi *Propionibacterium acnes* ATCC 6919 dengan eksogen fotosensitizer d-ALA pada penyinaran LED biru (430 nm intensitas 100 mW/m², 10 menit). Soares *et al.* (2009) meneliti fotoinaktivasi *Candida* dengan eksogen *toluidine blue O* dengan penyinaran LED merah (630 nm) dosis energi 180 J/cm², intensitas 200 mW/cm² dan waktu penyinaran 9 menit. Maclean *et al.* (2009) meneliti fotoinaktivasi bakteri *Staphylococcus aureus* NCTC 4135 dengan penyinaran LED biru 405 nm dosis 36 J/cm² (intensitas 10 mW/cm²) selama 60 menit.

Berbagai hasil penelitian foto-dinamik yang telah dilakukan menunjukkan bahwa keberhasilan fotoinaktivasi pada bakteri ditentukan oleh kesesuaian panjang gelombang cahaya dengan spektrum serap porfirin bakteri dan dosis energi penyinaran. Dosis energi yang sesuai akan mengaktifkan terjadinya reaksi kimia lanjutan menghasilkan berbagai spesies oksigen reaktif yang menyebabkan fotoinaktivasi pada bakteri. Dalam rangka mengembangkan penelitian fotodinamik tentang penentuan dosis energi fotoinaktivasi pada berbagai spektrum sumber cahaya, maka penelitian ini bertujuan untuk mencari dosis energi penyinaran LED yang optimal untuk fotoinaktivasi bakteri *Staphylococcus aureus* dengan porfirin endogen. Penelitian Astuti *et al.* (2009) menunjukkan bahwa LED biru 454 nm dan 430 nm (Astuti *et al.*, 2010) berpotensi fotoinaktivasi pada bakteri *Staphylococcus aureus* dan *Staphylococcus epidermidis*, sehingga sumber cahaya ini dapat digunakan untuk fotoinaktivasi bakteri. Tujuan penelitian ini untuk menentukan kinerja alat sumber cahaya LED yang dipakai untuk menginaktifkan kuman stafilocokus.

MATERI DAN METODE

Sampel penelitian adalah bakteri *Staphylococcus aureus* ATCC 6538P dengan media *Nutrient Broth* (Pronadisa CAT 1216), *Staphylococcus Agar* (Pronadisa CAT 1032), dan 0,1 M Phosphate Buffer Saline (PBS) pH 6,5. Peralatan yang diperlukan adalah seperangkat peralatan LED untuk penyinaran, peralatan sterilisasi, kultur dan penghitungan bakteri (otoklaf, laminar, shaker inkubator, spektroskopi UV-Vis, fluoresense dan *Quebec Colony Counter*).

Pertumbuhan bakteri

Bakteri ditumbuhkan pada media *Staphylococcus Agar* steril selama 18 jam, kemudian dipindahkan ke media *Nutrien broth* steril 50 ml dengan kerapatan (OD)

0,20–0,250 pada 660 nm, ditumbuhkan pada shaker inkubator temperatur 37° C selama 3 jam dengan OD 0,40–0,45 pada 660 nm. 10 ml suspensi diencerkan 50 kali dengan 0,1 M PBS pH 6,5 steril. 2 ml suspensi bakteri dimasukkan pada cawan plastik steril diameter 3,5 cm untuk penyiaran.

Metode eksperimen menggunakan rancangan acak lengkap pola faktorial (**Kusriningrum**, 2008), terdiri atas faktor A (daya penyiaran) 4 taraf (28, 57, 75 dan 96) mW dan faktor B (lama waktu penyiaran) 5 taraf (10, 20, 30, 40 dan 50) menit. Tiap perlakuan disertai kelompok kontrol. Jadi terdapat 20 kelompok perlakuan dengan pengulangan 3 kali.

Peralatan Penyiaran

Peralatan penyiaran adalah instrumen sumber cahaya LED biru **super bright produk lokal dengan arus maximum 30 mA dan tegangan 5 V**, berdimensi 20 × 20 cm yang terdiri dari 20 × 18 LED, dengan puncak emisi (429,8 ± 3,7) nm (Wavelength Meter SR 530 Stanford Research System Inc.) dan bandwidth 65 nm. Intensitas penyiaran diukur dengan Silicon Detector 818 SL, Newport SN 5592 dengan kalibrator laser He-Ne 543 nm Newport 811 pada jarak 2 cm dari sampel. Instrumen LED dilengkapi dengan mikrokontroler tipe AVR 8535 untuk pengaturan lama waktu penyiaran dan daya LED, motor servo (Paralax Continuous) yang memutar holder cawan petri bakteri untuk meratakan penyiaran, sensor suhu (LM 35) untuk mengendalikan temperatur serta dilengkapi display LCD untuk memberi input daya dan lama waktu penyiaran. Sebelum digunakan untuk penyiaran dilakukan pengukuran distribusi rapat daya penyiaran. Rangkaian LED dibagi menjadi 20 sel dengan masing-masing sel diukur rapat dayanya menggunakan alat ukur Silicon detector 818 SL Newport SN 5592 range panjang gelombang 400-1100 nm dengan kalibrator He-Ne laser 543 nm Newport 811 pada berbagai *Pulse Width Modulation* (PWM) sebanyak 100 kali pengukuran, jarak pengukuran 2, 3, 4 dan 5 cm dari cahaya LED.

Pengukuran Porfirin Endogen Bakteri *Staphylococcus aureus* Dengan HPLC

Ekstraksi porphyrin menggunakan metode **Fotinos et al.** (2008). 50 ml suspensi bakteri OD_{660nm} = 0,46 disentrifugasi 2500 × g selama 10 menit. Pelet diekstraksi dengan 2 ml larutan ethanol, dimethyl sulfoxide, acetic acid, 80:20:1; vol/vol/vol. Pemecahan sel bakteri dengan 5 siklus sonikasi masing-masing 5 detik pada temperatur 0° C menggunakan probe sonicator (sonics & materials Inc.). Selanjutnya

dilakukan sentrifugasi 13,500 × g selama 4 menit. Supernatan diencerkan dengan ethanol dan diukur dengan HPLC. Deteksi porfirin dengan HPLC Agilent 1100 series. 1 ml sampel porfirin dipisahkan dengan menggunakan metode **Schoenfeld et al.** (1994), menggunakan kolom LiChro CART@250-4 dan detektor sinar tampak dengan eksitasi 407 nm dan emisi 620 nm. Elusi menggunakan gradien 10% *acetonitrile v/v* dalam *methanol* (larutan A) dan 10% *acetonitrile* dalam 1M *ammonium acetate* pH 5,1 (larutan B). Elusi meliputi 30 menit gradien linear dari 100% B ke 10% B diikuti 12 menit gradien linear dari 35% B ke 10% B, elusi isokratik 5 menit dan penambahan 5 menit untuk kembali ke 100% B pada kecepatan alir 1 ml/menit. Sebagai standar digunakan *Porfirin Standard Chromatography marker kit* yang terdiri dari (10 ± 1) η mol 8, 7, 6, 5, 4 *carboxyl porfirin* dan mesoporfirin IX yang dilarutkan dalam 1 ml 1M NH₄OH serta 100 μ l standar Coproporfirin III dilarutkan dalam 1 ml ethanol.

Penyiaran Bakteri dengan LED

Cawan petri yang berisi bakteri diletakkan pada holder di dalam kotak acrylic diatas platform motor servo. Penyiaran LED biru (429,8 ± 3,7) nm dilakukan pada berbagai daya dan lama waktu penyiaran. Selanjutnya bakteri pada kelompok perlakuan dan kontrol ditumbuhkan pada media *Staphylococcus Agar* dan disimpan dalam inkubator temperatur 37° C selama 24 jam.

Penghitungan jumlah koloni bakteri

Sampel dikeluarkan dari inkubator dan dihitung jumlah koloni bakteri yang tumbuh dengan metode pencawanan (*Total Plate count*) menggunakan *Quebec Colony Counter*, dan dilakukan penghitungan jumlah prosentase penurunan jumlah koloni bakteri yang tumbuh pada tiap perlakuan:

$$| (\sum \text{koloni perlakuan} - \sum \text{koloni kontrol}) / \sum \text{koloni kontrol} | \times 100\%$$

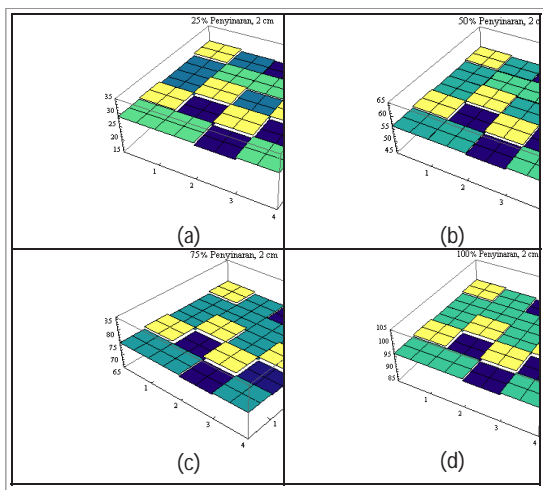
HASIL DAN DISKUSI

Hasil pengukuran performansi LED menunjukkan puncak emisi (430 ± 4) nm dan (629 ± 6) nm serta bandwidth 65 nm dan 30 nm diukur menggunakan Wavelength Meter SR 530 Stanford Research System Inc, kalibrator He-Ne laser 543 nm Newport 811. Pengukuran daya penyiaran LED pada berbagai *Pulse Width Modulation* (PWM) dan jarak penyiaran ditunjukkan pada *Tabel 1*.

Distribusi rapat daya penyiaran LED yang terukur di plat holder pada jarak penyiaran 2 cm pada berbagai nilai PWM menggunakan program Wolfram Mathematica 7.0 ditunjukkan pada *Gambar 1*.

Tabel 1. Distribusi Rapat daya LED biru 430 nm daya PWM 25%, 50%, 75% dan 100% pada plat holder

Jarak Penyinaran	Rapat daya rata-rata (mW/cm ²)			
	PWM 25%	PWM 50%	PWM 75%	PWM 100%
5 cm	28,04 ± 0,49	56,00 ± 0,59	75,07 ± 0,68	96,00 ± 0,72
4 cm	28,15 ± 0,48	56,04 ± 0,55	75,12 ± 0,62	96,01 ± 0,67
3 cm	28,25 ± 0,47	56,06 ± 0,50	75,23 ± 0,58	96,02 ± 0,61
2 cm	28,39 ± 0,47	56,12 ± 0,49	75,27 ± 0,57	96,06 ± 0,58
Rerata	1,70	0,94	0,82	0,67
% error				



Gambar 1. Distribusi rapat daya pada plat holder jarak penyinaran 2 cm dengan PWM (a) 25%, (b) 50%, (c) 75% dan (d) 100%.

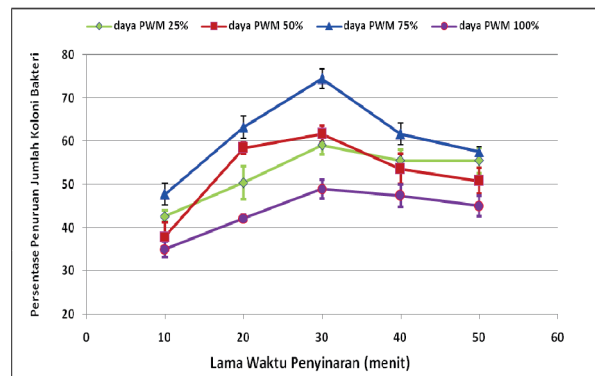
Perbedaan warna menunjukkan adanya perbedaan besarnya rapat daya penyinaran terkait dengan kualitas LED yang digunakan. Pengukuran rapat daya pada berbagai daya PWM dengan jarak penyinaran sama menunjukkan adanya kekonsistenan pola distribusi rapat daya penyinarannya.

Pada penelitian, adanya perbedaan besarnya rapat daya penyinaran ini dapat diatasi dengan memutar plat holder sampel menggunakan motor servo putaran rendah dengan kecepatan 0,73 cm/detik agar tiap sampel mendapatkan rapat daya penyinaran yang sama. Hasil uji *Independent Samples Test* menunjukkan bahwa tidak ada perbedaan bermakna antara kelompok sampel yang diputar dengan kelompok kontrol tanpa putaran.

Hasil pengukuran porfirin endogen bakteri *Staphylococcus aureus* dengan menggunakan HPLC merk Agilent 1100 series, kolom LiChro CART@250-4 dan detektor sinar tampak dengan eksitasi 407 nm dan emisi 620 nm ditunjukkan pada *Tabel 2*.

Hasil uji porfirin endogen bakteri *Staphylococcus aureus* menunjukkan bahwa bakteri ini mengakumulasi porfirin endogen terbesar tipe coproporfirin III, berdasarkan kesesuaian dengan *retention time* pada standar coproporfirin III. Porsi porfirin endogen tipe coproporfirin III sebesar 57,83% dan 20,17%.

Hasil uji anova faktorial menunjukkan bahwa faktor daya dan waktu serta interaksi daya-waktu penyinaran LED biru 430 nm berpengaruh terhadap persentase penurunan jumlah koloni bakteri. Hasil uji anova satu arah menunjukkan perbedaan antar kelompok perlakuan dengan penyinaran LED biru. Hasil uji Tukey menunjukkan bahwa variasi daya PWM 75% (75 mW/cm²) dengan jarak penyinaran 2 cm dari sumber cahaya LED biru dan durasi waktu penyinaran 30 menit (rapat energi 135 J/cm²) menghasilkan persentase penurunan jumlah koloni bakteri *Staphylococcus aureus* sebesar (75 ± 2)%, berbeda nyata dengan yang lain. *Gambar 2* menunjukkan bahwa pada daya PWM 75% (intensitas 75 mW/cm²) dan durasi waktu penyinaran 30 menit (rapat energi 135 J/cm²) menghasilkan persentase penurunan jumlah koloni bakteri terbesar.



Gambar 2. Diagram persentase penurunan jumlah koloni bakteri *Staphylococcus aureus* yang tumbuh pada penyinaran LED biru 430 nm.

Tabel 2. Hasil pengukuran standar porfirin, standar coproporfirin III (Cp III) dan porfirin endogen bakteri *Staphylococcus aureus* dengan HPLC

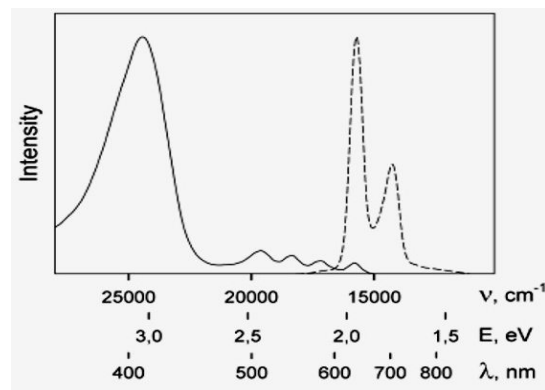
Nama	Luas Area							
	Retention Time							
	4.77	9.86	10.36	13.56	16.45	21.90	43.22	47.01
standar porfirin	121,14	33,07	90,83	13,25	135,71	139,47	-	-
Standar CP III	-	-	-	-	-	-	2216,00	387,18
Sampel	7,43	2,03	8,71	2,10	16,03	17,84	142,34	49,65
%	3,02	0,83	3,54	0,85	6,51	7,25	57,83	20,17

Hasil pengukuran distribusi intensitas LED menunjukkan persentasi error yang semakin mengecil untuk daya PWM yang semakin besar. Hal ini menunjukkan bahwa ketelitian pengukuran intensitas dari kalibrator semakin baik pada daya PWM besar. Distribusi intensitas yang terukur di plat holder pada jarak penyinaran 2 cm dengan berbagai nilai PWM menggunakan program Wolfram Mathematica 7.0 pada Gambar 4.3 menunjukkan adanya ketidakseragaman pola distribusi intensitas penyinaran yang konsisten pada jarak penyinaran sama. Ketidakseragaman distribusi intensitas ini terutama disebabkan oleh bahan LED yang memiliki kualitas yang tidak sama satu dengan lainnya. Pada penelitian, adanya perbedaan besarnya intensitas penyinaran ini diatasi dengan memutar plat holder sampel 5 putaran/detik dengan motor servo agar tiap sampel mendapatkan intensitas penyinaran yang sama (Johansen *et al.*, 2003).

Pengukuran menggunakan HPLC pada tabel 3 menunjukkan bahwa bakteri *Staphylococcus aureus* mengakumulasi porfirin endogen tipe Coproporfirin III pada retention time yang sesuai dengan standar Coproporfirin III. Hasil ini sesuai dengan penelitian Nitzan (2004) yang menunjukkan bahwa Gram positif *Staphylococci* mengakumulasi porfirin jenis coproporfirin III (68,3–74,6%) dengan spektrum serap pada cahaya biru.

Ada berbagai macam porfirin yang dihasilkan oleh bakteri (Bruce *et al.*, 2009; Wainwright, 2009). Masing-masing bakteri mengakumulasi jenis porfirin tertentu dengan spektrum serap yang bersifat spesifik (Ramberg & Johnsson, 2004). Gambar 3 menunjukkan karakteristik spektrum absorpsi dan fluoresensi porfirin tipe fotosensitizer. Pergeseran spektrum panjang gelombang dari spektrum absorpsi ke fluoresensi disebabkan karena adanya mekanisme transisi non radiatif seperti *internal conversion*, *vibrational relaxation* atau *intersystem crossing* dengan melepaskan panas ke lingkungan sehingga terjadi

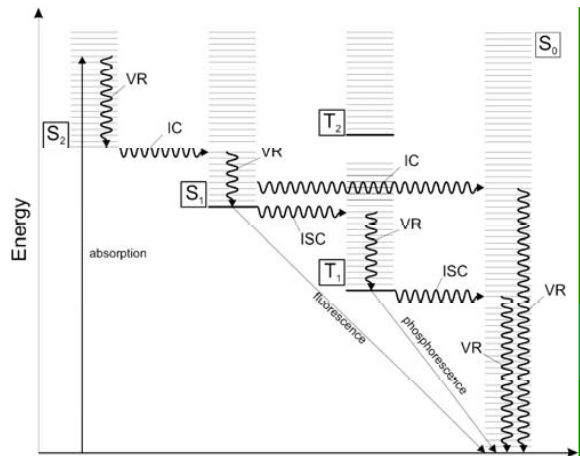
pengurangan energi foton saat terjadi transisi radiatif baik melalui fluoresensi pada eksitasi singlet dan fosforesensi pada eksitasi triplet.



Gambar 3. Karakteristik spektrum absorpsi (garis tebal) dan fluoresensi (garis putus-putus) porfirin tipe fotosensitizer (Juzenas, 2002).

Gambar 4 menunjukkan mekanisme fotofisika yang menginisiasi terjadinya mekanisme fotokimia menghasilkan berbagai spesies oksigen reaktif yang menyebabkan fotoinaktivasi pada bakteri. Absorpsi radiasi oleh molekul akan mengeksitasi molekul tersebut dari tingkat vibrasional dalam keadaan dasar singlet elektronik S_0 ke salah satu tingkat vibrasional dalam keadaan eksitasi elektronik. Eksitasi molekul menuju keadaan energi yang lebih tinggi ini cenderung kembali ke keadaan dasar, baik melalui reaksi kimia atau berubah menjadi panas yang dilepas ke lingkungan dalam proses *internal conversion* atau *vibrational relaxation*.

Spin sebuah elektron yang tereksitasi singlet S_n dapat terbalik, meninggalkan molekul pada keadaan eksitasi triplet T_n , yang disebut dengan *intersystem crossing*. Probabilitas terjadinya *intersystem crossing* meningkat



Gambar 4. Mekanisme fotofisika. S_0 adalah keadaan ground state. $S_1 \dots S_n$ adalah keadaan singlet ditandai dengan spin elektron berpasangan; $T_1 \dots T_n$ adalah keadaan triplet ditandai spin elektron tidak berpasangan; Tingkat vibrasi ditunjukkan oleh garis horisontal, transisi non radiatif oleh panah bergelombang, yang terdiri atas *vibrational relaxation* (VR), *internal conversion* (IC), dan *intersystem crossing* (ISC), Panah ke bawah menunjukkan transisi radiatif (Plaetzer, 2009).

Jika tingkat vibrasional singlet terendah mengalami overlap dengan satu dari tingkat vibrasional yang lebih tinggi dari keadaan triplet. Sebuah molekul pada tingkat vibrasional tinggi dari keadaan eksitasi triplet dapat kehilangan energi saat bertumbukan dengan molekul lain, meninggalkannya pada tingkat vibrasional paling rendah dari keadaan triplet, dan selanjutnya molekul dapat mengalami *intersystem crossing* kedua pada tingkat vibrasional yang lebih rendah. Molekul tersebut akhirnya kembali ke tingkat vibrasional paling rendah dari keadaan dasar elektronik S_0 oleh relaksasi vibrasi. Molekul pada keadaan eksitasi triplet tidak selalu kembali ke keadaan dasar melalui *intersystem crossing*, tetapi dapat kehilangan energi melalui emisi sebuah foton. Emisi dari transisi triplet-singlet disebut fosforesensi.

Keberhasilan fotoinaktivasi pada bakteri ditentukan oleh kesesuaian panjang gelombang cahaya dengan spektrum serap porfirin bakteri untuk terjadinya eksitasi molekul porfirin. Faktor penentu lain adalah dosis energi penyinaran. Dosis energi yang sesuai akan mengaktifkan terjadinya reaksi kimia menghasilkan berbagai spesies oksigen reaktif yang menyebabkan fotoinaktivasi pada bakteri. Dosis energi penyinaran LED tiap luas area penyinaran (rapat energi dengan satuan J/cm^2) adalah

besarnya energi penyinaran (daya kali lama waktu penyinaran) dibagi luas penyinaran.

Hasil uji statistik pada data penelitian menunjukkan bahwa faktor daya, waktu dan interaksi daya-waktu penyinaran LED biru berpengaruh terhadap persentase penurunan jumlah koloni bakteri *Staphylococcus aureus*. Kelompok perlakuan dengan variasi daya PWM 75% dan jarak penyinaran 2 cm dari sumber cahaya LED biru dengan lama waktu penyinaran 30 menit (rapat energi penyinaran $135 J/cm^2$) menghasilkan persentase penurunan jumlah koloni bakteri 75%, beda bermakna dengan kelompok perlakuan yang lain.

Berbagai penelitian mengenai fotoinaktivasi bakteri antara lain dilaporkan oleh Grinholtz *et al.* (2007) yang meneliti peran konsentrasi porfirin pada fotoinaktivasi pada bakteri *Staphylococcus aureus* resisten *methicillin* (40 MRSA) dan sensitif *methicillin* (40 MSSA) dengan penambahan eksogen fotosensitizer ALA dan protoporfirin IX dengan penyinaran lampu biostimul 624 nm dosis $0,2 J/cm^2$ tiap menit. Lipovsky *et al.* (2009) meneliti fotoinaktivasi bakteri *Staphylococcus aureus* pada strain 101 (*sensitif methicilin*) dan strain 500 (resisten *methicillin*) dengan penyinaran lampu halogen 415 nm, dosis energi optimal pada rapat energi $120 J/cm^2$ (intensitas $100 mW/cm^2$ dan lama waktu penyinaran 20 menit) menghasilkan penurunan koloni bakteri 90%. Pada panjang gelombang 455 nm dengan rapat energi yang sama menghasilkan penurunan 50%. Penelitian Maclean *et al.* (2009) dengan LED biru 405 nm dosis $36 J/cm^2$ (intensitas $10 mW/cm^2$ dan lama waktu penyinaran 60 menit) menghasilkan persentase penurunan koloni bakteri 14%.

Jika dibandingkan dengan hasil penelitian tersebut di atas, maka penggunaan LED biru 430 nm *super bright* bahan baku lokal pada penelitian ini dengan dosis energi $135 J/cm^2$ (intensitas $75 mW/cm^2$ dan lama waktu penyinaran 30 menit) cukup optimal menurunkan jumlah koloni bakteri sebesar 75%. Optimasi fotoinaktivasi ini dapat ditingkatkan dengan pemberian eksogen fotosensitizer δ -ALA untuk meningkatkan konsentrasi porfirin endogen bakteri sehingga penyerapan foton cahaya lebih efektif dan produksi oksigen reaktif lebih meningkat (Nitzan *et al.*, 2004).

Keberhasilan fotoinaktivasi bakteri melibatkan proses fotosensitisasi, yaitu proses penyerapan cahaya oleh porfirin yang selanjutnya mengaktifkan terjadinya reaksi kimia menghasilkan berbagai spesies oksigen reaktif.

Mekanisme awal fotosensitisasi berupa penyerapan foton. Absorpsi foton oleh molekul fotosensitizer akan mengeksitasi molekul tersebut dari tingkat vibrasional

dalam keadaan dasar singlet elektronik ke salah satu tingkat vibrasional dalam keadaan eksitasi elektronik. Ada tiga proses utama interaksi cahaya dengan materi yang dapat menginduksi perpindahan elektron dari dua keadaan energi terkuantisasi, yaitu (Wardle, 2009):

1. Absorpsi cahaya, yaitu penyerapan cahaya oleh atom/molekul organik diikuti dengan eksitasi atom/molekul molekul dari level vibrasional dalam keadaan dasar singlet elektronik S_0 ke salah satu level vibrasional dalam keadaan eksitasi elektronik. Peristiwa absorpsi primer ini berlangsung sangat cepat (sekitar 10–15 s). Dua prinsip dasar pada peristiwa absorpsi cahaya adalah:
 - a) Hukum Grothuss-Draper menyatakan hanya cahaya yang diabsorpsi oleh molekul kimia yang dapat menghasilkan perubahan reaksi kimia.
 - b) Hukum Stark-Einstein menyatakan bahwa absorpsi cahaya oleh molekul adalah proses satu kuantum. Satu foton akan diabsorpsi satu molekul.

Eksitasi molekul menuju keadaan energi yang lebih tinggi tidak stabil dan akan kembali ke keadaan dasar, baik secara langsung maupun melibatkan reaksi kimia (fotokimia). Perpindahan molekul dari keadaan eksitasi ke keadaan *ground state* dapat terjadi melalui (Wardle, 2009):

2. Emisi spontan terjadi ketika atom atau molekul yang tereksitasi mengemisikan foton yang memiliki energi sebanding dengan energi dari dua keadaan elektronik tanpa mempengaruhi atom/molekul lain.
3. Emisi terangsang (umumnya pada eksitasi triplet) terjadi ketika satu foton yang memiliki energi sebanding dengan energi dari dua keadaan elektronik berinteraksi dengan sebuah atom/molekul yang tereksitasi. Pada keadaan eksitasi triplet ini, molekul porfirin tidak serta merta bertransisi ke *ground state* karena dilarang oleh aturan Pauli (Grossweiner, 2005), sehingga memiliki life time yang cukup lama (sekitar 10^{-2} – 10^2 detik). Molekul ini selanjutnya mentransfer energinya ke molekul oksigen (reaksi fotokimia) menyebabkan perpindahan molekul oksigen dari eksitasi triplet ke eksitasi singlet di atas *ground state* (Karotki et al., 2001).

Fotokimia merupakan perubahan kimia yang disebabkan oleh cahaya (Coyle, 1991), dan hanya terjadi jika cahaya diabsorpsi oleh sistem (Wardle, 2009). Perubahan kimia merupakan peristiwa yang muncul pada tingkatan molekuler akibat absorpsi oleh foton. Proses fotokimia memiliki kaitan erat dengan proses fotofisika, yang berperan dalam perubahan energi dan struktur elektronik akibat eksitasi

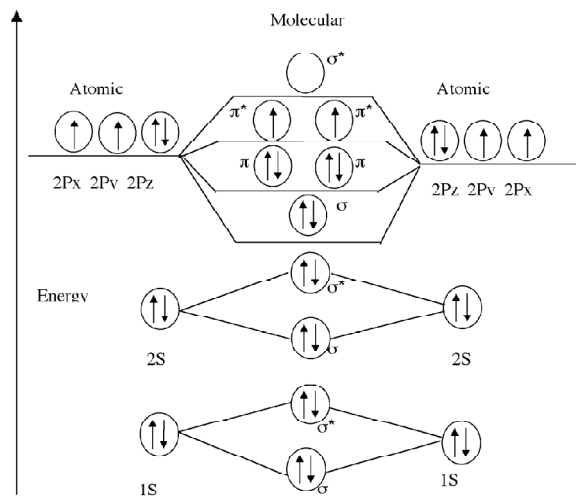
molekul setelah peristiwa absorpsi. Reaksi fotokimia oleh porfirin terjadi pada keadaan triplet tereksitasi.

Mekanisme reaksi fotokimia pada molekul fotosensitiser umumnya terjadi melalui:

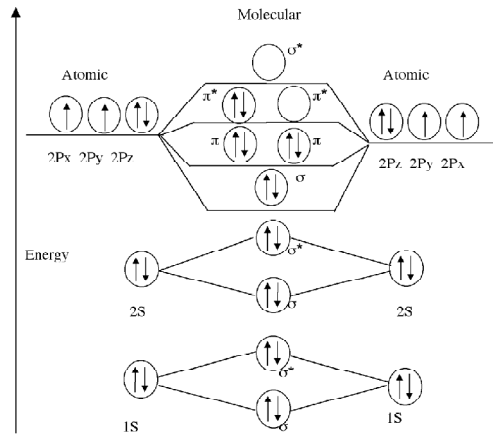
Tipe 1, molekul fotosensitif yang tereksitasi secara optis bereaksi secara langsung dengan substrat seperti membran sel atau molekul, dan mentransfer sebuah proton atau elektron membentuk anion atau kation radikal. Radikal ini akan bereaksi dengan oksigen menghasilkan oksigen reaktif (ROS). Superoksida anion yang terbentuk akan bereaksi dengan substrat menghasilkan hidrogen peroksida (H_2O_2). Pada konsentrasi tinggi hidrogen peroksida bereaksi dengan superoksida anion membentuk hidroksil radikal (reaksi Haber Weiss) yang dengan mudah berdifusi melalui membran dan merusak sel (Plaetzer, 2009).

Tipe 2, fotosensitiser triplet dapat mentransfer energinya secara langsung pada molekul oksigen yang berada pada keadaan eksitasi triplet membentuk oksigen singlet (1O_2) tereksitasi. Pada keadaan dasar, kebanyakan molekul organik memiliki semua pasangan spin elektron. Selama transisi elektronik, ketika elektron mengalami eksitasi ke tingkat energi yang lebih tinggi, elektron menjadi orbital yang tidak berpasangan. Spin mereka diorientasikan dalam bentuk anti paralel atau paralel yang lain. Gambar 4 dan 5 menunjukkan molekul orbital oksigen triplet dan singlet.

Berdasarkan Gambar 4 pada keadaan eksitasi triplet, molekul oksigen memiliki dua elektron tak berpasangan dengan spin paralel yang membangkitkan dua orbital antibonding. Oksigen singlet merepresentasikan keadaan eksitasi singlet yang ditunjukkan oleh pasangan elektron dengan spin terbalik pada orbital luar (Gambar 5).

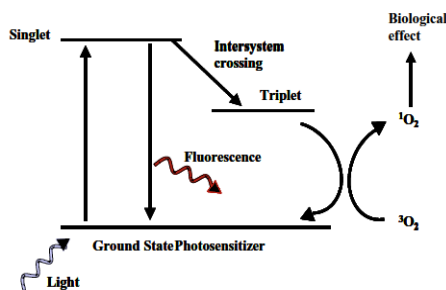


Gambar 4. Molekuler orbital dari oksigen triplet (Min & Lee, 1999).



Gambar 5. Molekuler orbital dari oksigen singlet (Min & Lee, 1999).

Molekul oksigen dapat berada pada keadaan eksitasi triplet, sehingga dapat bereaksi secara langsung dengan fotosensitizer triplet menghasilkan oksigen singlet seperti yang ditunjukkan oleh Gambar 6.



Gambar 6. Diagram level energi reaksi fotokimia tipe II (Wilson, 2005).

Fotosensitizer untuk aplikasi fotodinamik umumnya memiliki medan kuantum sekitar 0,3 sampai 0,5 yang menentukan keberhasilan pembentukan oksigen singlet. Medan kuantum adalah ukuran efisiensi dari banyaknya foton yang diabsorpsi. Medan kuantum (Φ) adalah banyaknya molekul fotosensitizer dibagi jumlah foton yang diabsorpsi oleh fotosensitizer. Berdasarkan hukum Stark Einstein, nilai maksimum $\Phi = 1$ (Wardle, 2009). Oksigen singlet sangat reaktif dengan bio molekul, memiliki life time $< 1 \mu s$ dan dalam sel atau jaringan dengan jarak difusi yang sangat kecil $< \mu m$ sehingga letak fotosensitizer sangat menentukan lokasi kerusakan akibat reaksi fotokimia yang menghasilkan respons biologi. Umumnya porfirin fotosensitizer berlokasi pada membran sel, mitokondria, membran plasma dan lisosom.

Dari hasil penelitian dapat disimpulkan bahwa Bakteri *Staphylococcus aureus* ATCC 6538P mengakumulasi porfirin endogen tipe coproporfirin III dan faktor daya, waktu dan interaksi daya-waktu penyinaran LED biru ($429,8 \pm 3,7$) berpengaruh terhadap prosentase penurunan jumlah koloni bakteri *Staphylococcus aureus* ATCC 6538P, dengan Dosis energi penyinaran LED biru yang optimal untuk fotoinaktivasi bakteri *Staphylococcus aureus* ATCC 6538P adalah pada daya Power With Modulation (PWM) 75% (rapat daya 75 mW/cm^2) dan durasi waktu penyinaran 30 menit (rapat energi 135 J/cm^2).

DAFTAR PUSTAKA

- Astuti SD**, 2010. Potensi Photodinamik Inaktivasi Bakteri *Staphylococcus aureus* dengan Endogen Photosensitizer Pada Penyinaran LED biru ($429,8 \pm 3,7$) nm dan merah ($628,7 \pm 6,3$) nm, Seminar Nasional Basic Science VII, Universitas Brawijaya, Malang.
- Astuti SD, Puspitasari AT, Supriyanto A**, 2009. The Optimal Lethal Dose of Blue Light (454 nm) Exposure with Light Emitting Diodes (LED) Device in *Staphylococcus Aureus* Bacteria, Second International conference and Workshops on Basic and Applied Sciences & Regional Annual Fundamental Science Seminar, UTM.
- Bruce-Micah R, Huttenberger D, Freitag L, Cullun J, Foth H-J**, 2009. Pharmacokinetic of ALA and h-ALA Induced Porphyrins in the Models *Mycobacterium phlei* and *Mycobacterium*, *Journal of Photochemistry and Photobiology*, 91: 1–7.
- Coyle, John D**, 1991. Introduction to Organic Photochemistry. John Willey Sons: London.
- Grinholc M, Szramka B, Kurlenda J, Graczyk A, Bielawski K**, 2007. Bcatericidal Effect of Photodynamic inactivation against methilin resistant and methilin susceptible *Staphylococcus aureus* is strains Dependent, *J. of Photochem & Photobiology*, 90, 57–58.
- Grossweiner LI**, 2005. The Science of Phototherapy: An Introduction. Springer: USA.
- Hamblin MR, Hasan T**, 2004. Photodynamic therapy: a new antimicrobial approach to infectious disease? *J of Photochem & Photobiology*, 3: 436–450.
- Jawetz, Melnick, Alderberg's**, 2001. Medical Microbiology, McGraw-Hill Companies Inc. 22nd edition, 235–23.

- Johansen Y, Widerøe HC, Krane J, Johnsson A**, 2003. Proton magic angle spinning NMR reveals new features in photodynamically treated bacteria, *Z. Naturforsch*, 58c: 401–407.
- Karotki A, Kruk M, Drobizhev M, Rebane A, Nickel E, Spangler CW**, 2001. Efficient Singlet Oxygen Generation Upon Two-photon Excitation of new Porphyrin with Enhanced Non Linear Absorption, *IEEE Journal Sel Top Quantum Electron*, 7: 971–975.
- Karu T**, 2003. *Low Power Laser Therapy* CRC Press LLC: New York.
- Kusriningrum RS**, 2008. *Perancangan Percobaan*, Airlangga University Press, Surabaya.
- Lipovsky A, Nitzan Y, Friedmann H, Lubart R**, 2009. Sensitivity of *Staphylococcus aureus* strains to broadband visible Light, *J of Photochem & Photobiology*, 85: 255–260.
- MacLean M, MacGregor SJ, Anderson JG, Woolsey GA**, 2008. The Role of Oxygen in the visible-light os *Staphylococcus aureus* bacteria, *J. of Photochem & Photobiology*, 92: 180–184.
- MacLean M, MacGregor SJ, Anderson JG, Woolsey GA**, 2009. Inactivation of bacterial Photogens Following exposure to light from a 405 nm Light Emitting Diode Array, *Applied and Environmental Microbiology*, 75(7): 1932–1937.
- Makarska M & S Radzki**, 2002. Water-soluble porphyrins and their metal complexes. *Annales Universitatis Mariae Curie-Sklowdoska Lublin, Polonia*. Vol. LVII, 17.
- Nitzan Y & Ashkenazi H**, 2001. Photoinactivation of *Acinetobacter baumannii* and *Escheria coli* B by a cationic hydrophilic porphyrin at various light wavelengths, *Curr. Microbiol*, 42: 408–414.
- Nitzan Y, Divon MS, Shporen E, Malik Z**, 2004. ALA Induced Photodynamic Effect on Gram Positive and Negative bacteria, *Journal Photochem & Photobiol*, 3: 430–435.
- Papageorgiu P et al.**, 2000. Phototherapy with Blue (415 nm) and Red (660 nm) Light in The Treatment of *Acne Vulgaris*, *British Journal of Dermatology*.
- Plaetzer K, Krammer B, Berlanda J, Berr F**, 2009. Photophysics and Photochemistry of Photodynamic Therapy: Fundamental Aspects, *Journal of Laser Medical Sciences*, 24: 259–268.
- Ramberg K, Meló TB, Johnsson A**, 2004. In Situ Assesment of Porphyrin Photosensitizer in *P. acnes*, *Z. Naturforsch*, 59C: 93–98.
- Ross DA**, 1979. *Optoelectronic Devices and Optical Imaging Techniques*, The Macmillan Press Ltd, pp. 11–19.
- Schubert EF**, 2006. *Light Emitting Diodes*, 2nd ed., Cambridge University Press, USA.
- Soares BM, da Silva DL, Sousa GR, Amorim JCF, de Resende M.A., Pinotti M., Cisalpino P.S.**, 2009. In vitro Photodynamic Inactivation of *Candida* spp. Growth and Adhesion Buccal Epithelial Cells, *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology*, Elsevier 2009, 94: 65–70.
- Wainwright M**, 2009. *Photosensitizers in Biomedicines*, John Willey & Sons Ltd.
- Wardle B**, 2009. *Principles and Applications of Photochemistry*, John Willey & Sons Ltd.