

Efek Fotodinamik Laser Dioda Merah Dengan Eksogen Metilen Biru Pada Biofilm *Staphylococcus aureus*

Suryani Dyah Astuti^{*1,2}, Rafika Fitria Puspasari¹, and Samian¹, Wahyu Intan Pertiwi³

¹Departement of Physics, Faculty Science and Technology-Universitas Airlangga, Surabaya – Indonesia 60115

²Biophysics and Medical Physics Research Group, Faculty of Sciences and Technology, Universitas Airlangga, Surabaya-Indonesia 60115

³Magister of Biomedical Engineering, Faculty Science and Technology-Universitas Airlangga, Surabaya – Indonesia 60115

e-mail: ^{*1}suryanidyah@fst.unair.ac.id, ²rafika.fitria21@gmail.com,
³samian@fst.unair.ac.id, ⁴wahyu.intan.pertiwi-2019@fst.unair.ac.id

Abstrak

*Biofilm adalah kumpulan mikroorganisme yang menempel pada suatu permukaan dengan membentuk matriks Extracellular Polymeric Substance (EPS) sehingga bakteri mampu bertahan dari ancaman fisis, kimiawi, atau biologis. Biofilm bekerja dengan menolak aktivitas sistem imun dan menciptakan resistensi terhadap antibiotik yang menyebabkan biofilm resistan terhadap agen antimikroba seperti antibiotik, desinfektan, dan germisida. Permasalahan resistansi akibat biofilm membutuhkan penanganan yang lebih tepat, salah satunya dengan metode fotodinamik inaktivasi. Fotodinamik inaktivasi adalah metode penghambatan aktivitas metabolisme sel yang memanfaatkan interaksi antara cahaya dengan molekul fotosensitizer sehingga menyebabkan kematian sel bakteri. Metilen biru merupakan fotosensitizer eksogen yang dapat menghasilkan oksigen singlet apabila terkena oksigen dan cahaya menghasilkan ROS yang mereduksi biofilm. Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui dosis energi yang efektif untuk mereduksi biofilm *Staphylococcus aureus* dengan penambahan metilen biru sebagai fotosensitizer. Perlakuan dibagi menjadi 4 kelompok, kelompok kontrol tanpa ada perlakuan apapun, kelompok kontrol positif dengan penambahan fotosensitizer metilen biru, perlakuan laser, dan perlakuan laser dengan penambahan metilen biru. Perlakuan laser memiliki variasi pemaparan sebesar 60 detik (10,96 J / cm²), 120 detik (21,92 J / cm²), 180 detik (32,88 J / cm²), 240 detik (43,84 J / cm²), dan 300 detik (54,80 J / cm²). Reduksi biofilm diukur menggunakan ELISA reader dan dianalisis dengan uji ANOVA faktorial. Hasil penelitian menunjukkan bahwa fotoinaktivasi dengan metilen biru 5 µM selama 5 menit mampu mereduksi biofilm bakteri sebesar %. Treatment dengan laser diode merah dengan rapat energi penyinaran 54,80 J/cm² selama 5 menit menghasilkan reduksi biofilm sebesar 69,11% dan 92,01% untuk perlakuan laser diode merah dengan penambahan fotosensitizer metilen biru 5 µM. Sehingga kombinasi laser dengan fotosensitizer metilen biru optimal untuk mereduksi biofilm *Staphylococcus aureus*.*

Kata kunci—3-5 kata kunci, Algoritma A, algoritma B, kompleksitas

Abstract

Biofilm is a collection of microorganisms that attach to a surface by forming a matrix of Extracellular Polymeric Substance (EPS) so that bacteria can survive

physical, chemical, or biological threats. Biofilms work by rejecting the activity of the immune system and creating resistance to antibiotics that cause biofilms to be resistant to antimicrobial agents such as antibiotics, disinfectants, and germicides. Resistance problems due to biofilms require more precise handling, one of them is the photodynamic method of inactivation. Photodynamic inactivation is a method of inhibiting cell metabolic activity that utilizes the interaction between light and photosensitizing molecules, causing bacterial cell death. Methylene blue is an exogenous photosensitizer that can produce singlet oxygen when exposed to oxygen and light produces ROS which reduces biofilm. This study aims to determine the effective energy dosage for reducing *Staphylococcus aureus* biofilm by adding methylene blue as photosensitizer. The treatment was divided into three groups, the control group without any treatment, the control group with methylene blue photosensitizer, laser treatment group, and methylene blue and laser treatment groups. The laser treatment group has variation of exposure time 60s (10.96 J / cm²), 120s (21.92 J / cm²), 180s (32.88 J / cm²), 240s (43.84 J / cm²), and 300s (54.80 J / cm²). Biofilm reduction was measured using an ELISA reader and analyzed using factorial ANOVA. The results showed that photoinactivation with 5 µM methylene blue for 5 minutes reduced bacterial biofilms by 58.34%. Treatment with a red laser diode with a radiation energy density of 54.80 J/cm² for 5 minutes resulted in biofilm reduction of 69.11% and 92.01% for red laser diode treatment with the addition of 5 µM methylene blue photosensitizer. So that the laser combination with methylene blue photosensitizer is optimal for reducing *Staphylococcus aureus* biofilm.

Keywords— *photoinactivation, red diode laser, Staphylococcus aureus biofilm, methylene blue*

1. Pendahuluan

Penyakit infeksi menjadi masalah kesehatan yang harus diperhatikan terutama di negara berkembang. Penyakit infeksi yang menyerang manusia salah satunya disebabkan oleh bakteri *Staphylococcus aureus* yang termasuk dalam jenis bakteri gram positif. Infeksi yang disebabkan oleh bakteri *Staphylococcus aureus* diantaranya bisul, jerawat, pneumonia, meningitis, dan artritis (Firmansyah, 2015). Bakteri *Staphylococcus aureus* dapat mengalami resistensi terhadap antibiotik, sehingga mampu hidup meski diberi antibiotik. Selain itu bakteri memiliki kemampuan membentuk biofilm sehingga meningkatkan resistensi terhadap antibiotik.

Biofilm adalah kumpulan mikroorganisme yang menempel pada suatu permukaan dengan membentuk matriks *Extracellular Polymeric Substance* (EPS) (Donlan, 2002) yang menyebabkan biofilm secara alami resistan terhadap agen antimikroba seperti antibiotik, desinfektan, dan germisida (Gunardi *et al.*, 2007). Adanya biofilm mengakibatkan bakteri mampu bertahan dari ancaman fisis, kimiawi, atau biologis. Biofilm bekerja dengan menolak aktivitas sistem imun dan menciptakan resistensi terhadap antibiotik (Stephens, 2002).

Resistensi terhadap antibiotik merupakan salah satu karakteristik dari biofilm. Penyebab adanya resistensi karena penggunaan antibiotik yang kurang tepat serta adanya sifat alami biofilm sehingga antibiotik tidak dapat mereduksi bakteri. Resistensi bakteri terhadap antibiotik menjadi salah satu masalah serius dalam dunia kesehatan. Data *Cancer for Disease Prevention* menyebutkan bahwa 13.300

pasien meninggal akibat infeksi bakteri yang resisten (Setiawati, 2015).

Permasalahan resistansi akibat biofilm membutuhkan penanganan yang lebih tepat, salah satunya dengan metode fotodinamik inaktivasi. Fotodinamik inaktivasi adalah metode penghambatan aktivitas metabolisme sel yang memanfaatkan interaksi antara cahaya dengan molekul fotosensitizer sehingga menyebabkan kematian sel bakteri. Hal ini dimanfaatkan untuk menghancurkan sel target dengan cara oksidasi yang menyebabkan lisis sel dan inaktivasi protein membran (Pereira *et. al.*, 2018).

Photodynamic Inactivation (PDI) memiliki tiga komponen utama, yakni cahaya, fotosensitizer serta oksigen (Rusydi, 2015). Fotosensitizer adalah suatu molekul yang bersifat peka terhadap cahaya. Interaksi antara cahaya dengan fotosensitizer terjadi jika adanya kesesuaian antara panjang gelombang serap fotosensitizer dan panjang gelombang sumber cahaya. Interaksi antara keduanya mampu menyebabkan elektron pada fotosensitizer tereksitasi sehingga menyebabkan ketidakstabilan. Elektron yang tidak stabil memiliki kecenderungan untuk kembali ke kondisi semula. Jika molekul fotosensitizer berinteraksi dengan oksigen menyebabkan terbentuknya ROS (*Reactive Oxygen Species*) yang mampu memicu kematian sel bakteri.

Fotosensitizer dibagi menjadi 2 yaitu fotosensitizer endogen dan eksogen. Secara alamiah, bakteri mempunyai senyawa porfirin sebagai fotosensitizer endogen yang peka terhadap cahaya. Penelitian Papageorgiou (2000) menunjukkan bahwa penyinaran cahaya dengan spektrum panjang gelombang yang sesuai dengan spektrum serap

fotosensitiser porfirin serta dosis energi penyinaran yang tepat mampu menyebabkan fotoinaktivasi sel bakteri.. Sedangkan fotosensitiser eksogen adalah molekul yang berupa bahan metal, organik atau logam yang ditambahkan. Nugraha (2006) melaporkan bahwa penggunaan fotosensitiser eksogen harus memiliki toksisitas rendah dalam keadaan tanpa cahaya. Salah satu fotosensitiser eksogen yang umumnya digunakan di bidang kedokteran adalah metilen biru.

Metilen biru merupakan fotosensitiser eksogen yang dapat menghasilkan oksigen singlet apabila terkena oksigen dan cahaya. Aisa *et al.*, (2009) menyatakan bahwa metilen biru efektif untuk mereduksi bakteri gram positif dan gram negatif. Metilen biru menjadi agen pewarnaan jaringan vital, penawar racun terhadap nitrit/anilin, antiseptik, anti rematik dan mempunyai toksisitas rendah. Toksisitas suatu zat dapat diketahui melalui nilai MLC (*Minimum Lethal Concentration*), yaitu konsentrasi terendah zat toksik yang mampu membunuh spesies uji pada kondisi yang telah ditetapkan. Pada penelitian Phoenix (2003) menyatakan bahwa metilen biru yang diuji dalam kondisi gelap menunjukkan nilai MLC sebesar 10 μM . Hasil penelitian D. Melgoza (2009) menunjukkan bahwa spektrum absorbansi metilen biru berada pada panjang gelombang 200 nm hingga 700 nm dengan puncak absorbansi pada panjang gelombang 665 nm.

Laser dioda merah menjadi salah satu sumber cahaya yang memiliki panjang gelombang yang sesuai dengan panjang gelombang serap dari metilen biru. Laser dioda merah memiliki spektrum panjang gelombang antara 620-750 nm, sehingga sesuai dengan spektrum serap metilen biru.

Berkas cahaya keluaran laser dioda bersifat koheren, monokromatis dan sejajar (*collimation*) (Csele, 2004). Penelitian Pratiwi (2014) juga menyatakan bahwa metilen biru mampu mengabsorpsi cahaya laser dengan panjang gelombang maksimal 661 nm sehingga sesuai jika diaplikasikan dengan laser dioda merah.

Penelitian Pereira *et al.*, (2018) menunjukkan bahwa metilen biru dengan konsentrasi 0,1 mg/L yang dikombinasikan dengan laser dioda merah (660 nm) mampu mereduksi bakteri *E. coli* sebesar 99,1%. Del *et al.* (2005) melaporkan terapi fotodinamik yang menggunakan sumber cahaya laser dioda dengan fotosensitiser metilen biru memiliki potensi untuk perawatan penyakit kanker atau non kanker pada toksisitas rendah sehingga tidak menimbulkan efek samping. Pada penelitian Heineck *et al.*, (2015) menyatakan bahwa laser dioda (45 J/cm²) dengan fotosensitiser eksogen metilen biru mampu mereduksi biofilm *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* sebesar 57%.

Berdasarkan permasalahan tersebut, maka penelitian ini dilakukan untuk mengetahui efisiensi fotodinamik terapi menggunakan laser diode merah dan fotosensitiser metilen biru terhadap biofilm *Staphylococcus aureus* sebagai target. Pada penelitian ini digunakan variasi rapat energi pemaparan laser.

2. Bahan dan Metode

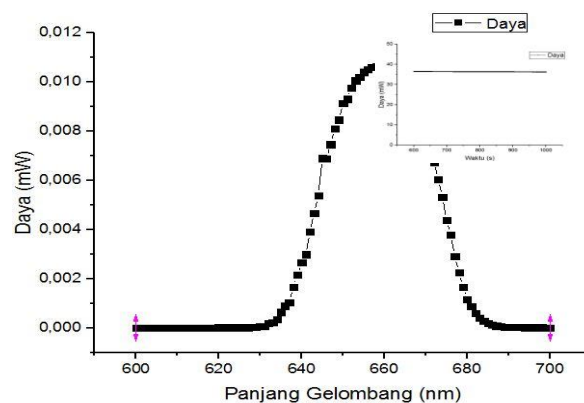
Penelitian ini menggunakan bakteri gram positif *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 yang diperoleh dari Balai Besar Laboratorium Kesehatan Surabaya. Bakteri dikultur menggunakan *Tryptone Soy Broth* (TSB) hingga memperoleh nilai *Optical Density* (OD) 595nm sebesar 0,5.

Panjang Gelombang (nm)	Daya Laser (mW)	Luas Penampang (cm ²)	Waktu (s)	Rapat Energi (J/cm ²)
(658,0 ± 0,05)	(36,53 ± 0,05)	(0,20 ± 0,01)	60 ± 0,05	10,96
			120 ± 0,05	21,92
			180 ± 0,05	32,88
			240 ± 0,05	43,84
			300 ± 0,05	54,80

Kultur ditambah sukrosa 2% lalu diambil sebanyak 100 µM ditempatkan pada *micro-well plate* dan diinkubasi selama 48 jam. Fotosensitizer yang digunakan dalam penelitian ini adalah larutan metilen biru dengan variasi konsentrasi 0 µM, 5 µM, 10 µM, dan 20 µM. Konsentrasi metilen biru yang digunakan sebagai fotosensitizer sebesar 5 µM dengan melakukan uji antibiofilm metode difusi. Sumber cahaya yang digunakan adalah laser dioda merah (658,00±0,05) nm, intensitas berkas (182,00±0,01) mWcm⁻² dengan luas berkas (0,20±0,01) cm². Perlakuan dibagi menjadi 4 kelompok, kelompok kontrol tanpa ada perlakuan apapun, kelompok kontrol positif dengan penambahan fotosensitizer metilen biru, perlakuan laser, dan perlakuan laser dengan penambahan metilen biru. Perlakuan laser memiliki variasi pemaparan sebesar 60 detik (10,96 J/cm²), 120 detik (21,92 J/cm²), 180 detik (32,88 J/cm²), 240 detik (43,84 J/cm²), dan 300 detik (54,80 J/cm²). Reduksi biofilm diukur menggunakan *ELISA reader*. Persentase reduksi biofilm dihitung melalui konversi nilai OD hasil pembacaan *ELISA reader* menjadi Log cfu/ml. Uji statistik dengan uji SPSS ANOVA faktorial dan uji Tukey pada $p < 0,05$.

3. Hasil dan Pembahasan

Laser dioda merah yang digunakan dalam penelitian ini memiliki diameter berkas keluaran sebesar (0,50±0,01) cm pada jarak 1 cm dari target, diameter berkas laser ini sesuai dengan diameter *microwell-plate*. Hasil karakterisasi suhu laser diperoleh sebesar (29,30±0,245). Kestabilan suhu laser harus dikarakterisasi untuk menunjukkan bahwa penyebab kematian bakteri *S.aureus* bukanlah suhu yang tinggi, melainkan akibat dari adanya ROS. Hasil karakterisasi laser dioda merah menunjukkan panjang gelombang puncak sebesar 658 nm dengan stabilitas daya waktu setelah 600 detik pada jarak (1,00±0,05) cm dengan daya (36,53±0,005) mW .

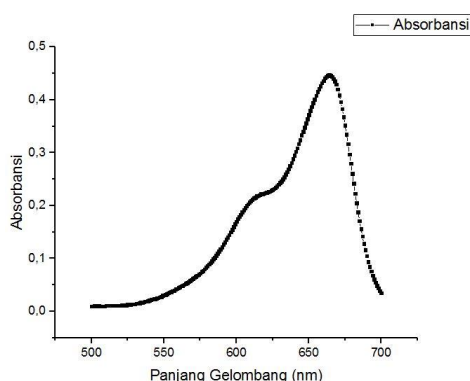


Gambar 1 : Karakterisasi Laser Dioda Merah. Gambar yang ditambahkan adalah stabilitas daya laser

Berdasarkan hasil berkas keluaran laser dapat dihitung dosis pemaparan laser dengan lama waktu penyinaran. Hasil perhitungan dapat dilihat pada Tabel 4.1

Tabel 4.1 Hasil Perhitungan dosis pemaparan laser dioda merah

Melalui uji antibakteri dengan metode difusi, diperoleh bahwa metilen biru dengan konsentrasi 5 µM menunjukkan zona hambat sebesar (7,0±0,5) mm. Zona hambat yang dihasilkan metilen biru 5 µM lebih kecil daripada konsentrasi metilen biru yang lain. Oleh karena itu, dalam penelitian ini konsentrasi metilen biru yang digunakan dalam penelitian sebesar 5 µM.



Gambar 1. Absorbansi metilen biru

Hasil penelitian Whang et. al., (2009) menunjukkan rentang spektrum UV-Vis metilen biru berkisar antara panjang gelombang 350 nm hingga 800 nm dengan absorbansi maksimum pada 668 nm. Hasil penelitian Patel (2009) juga menunjukkan bahwa spektrum metilen biru berada pada kisaran panjang gelombang 200 nm hingga 700 nm dengan puncak gelombang pada 665 nm. Hasil uji absorbansi metilen biru dalam penelitian ini menunjukkan puncak absorbansi metilen biru pada panjang gelombang 663 nm. Besar energi yang dapat mengeksitasi foton berdasarkan panjang gelombang metilen biru (663 nm) dapat dihitung melalui persamaan $E = \frac{hc}{\lambda}$ sebesar 1,872 eV. Laser merah dalam penelitian ini memiliki puncak panjang gelombang pada (658,0±0,05) nm dengan persentase absorbansi sebesar :

$$T = \exp(-A)$$

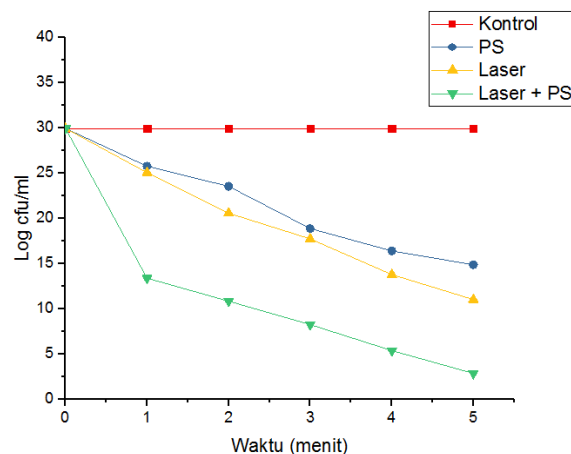
$$= 0,653$$

$$\begin{aligned} \text{Maka, \%A} &= (1 - T) 100\% \\ &= (1 - 0,653) 100\% \\ &= 34,70\% \end{aligned}$$

Jadi persentase absorbansi metilen biru sebesar 34,70%

Besar energi laser dihitung sehingga diperoleh energi laser sebesar 1,886 eV. Energi laser pada penelitian ini digunakan untuk mengeksitasi metilen biru ke keadaan singlet tereksitasi sehingga memicu terjadinya proses fotokimia.

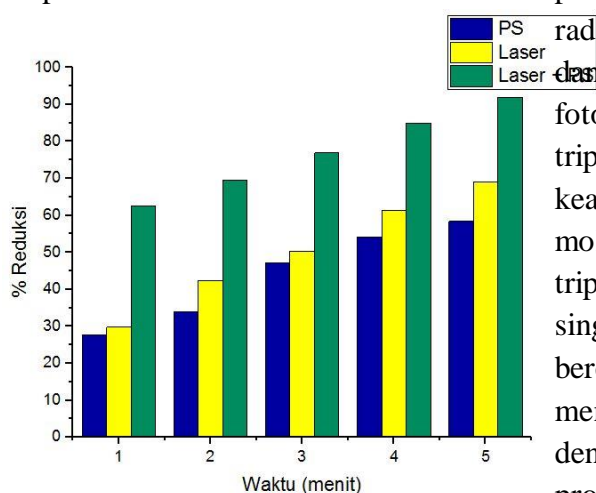
Penelitian ini dilakukan menjadi 4 kelompok perlakuan, yaitu kelompok kontrol tanpa perlakuan apapun, kelompok perlakuan dengan penambahan fotosensitizer, pemaparan laser saja dan kelompok perlakuan dengan pemaparan laser serta penambahan fotosensitizer. Hasil data perlakuan dilakukan perhitungan log cfu/ml yang ditunjukkan pada Gambar 2.



Gambar 2 : Grafik log cfu/ml terhadap waktu pemaparan

Perlakuan dibagi menjadi 4 kelompok, kelompok kontrol tanpa ada perlakuan apapun, kelompok kontrol positif dengan penambahan fotosensitizer metilen biru, perlakuan laser, dan perlakuan laser dengan penambahan metilen biru. Perlakuan laser memiliki variasi pemaparan sebesar 60 detik (10,96

J/cm²), 120 detik (21,92 J/cm²), 180 detik (32,88 J/cm²), 240 detik (43,84 J/cm²), dan 300 detik (54,80 J/cm²). Perlakuan yang paling potensial untuk meningkatkan reduksi biofilm *S. aureus* adalah perlakuan pemaparan laser dengan rapat energi sebesar 54,80 J/cm² mereduksi 69,11% untuk kelompok perlakuan laser, 92,01% untuk kelompok perlakuan metilen biru yang diaktivasi oleh laser pemaparan selama 300 detik. Hasil analisis faktorial ANOVA menunjukkan nilai signifikansi kelompok perlakuan dengan fotosensitizer saja, laser saja dan kelompok perlakuan dengan laser penambahan fotosensitizer adalah 0,000. Nilai signifikansi dari ketiga kelompok kurang dari 0,05 maka terdapat perbedaan yang signifikan diantara kelompok perlakuan.



Gambar 3 : Grafik hubungan persentase reduksi biofilm *Staphylococcus aureus* terhadap waktu pemaparan laser

Gambar 3 menjelaskan bahwa besar reduksi biofilm *S.aureus* disebabkan fotoinaktivasi dengan kelompok perlakuan pemaparan laser dengan penambahan metilen biru yang mampu mereduksi biofilm *S. aureus* sebesar 92,01%. Mekanisme fotoinaktivasi diawali dengan proses fotofisika yaitu proses absorpsi cahaya oleh fotosensitizer. Cahaya dengan panjang gelombang sesuai dengan

absorbansi fotosensitizer akan diserap sehingga menyebabkan fotosensitizer keadaan singlet tereksitasi menuju fotosensitizer keadaan triplet tereksitasi. Fotosensitizer keadaan triplet tereksitasi dapat bereaksi dengan molekul oksigen keadaan dasar melalui dua reaksi fotokimia yang berbeda. Reaksi fotokimia tipe I terjadi saat fotosensitizer keadaan triplet tereksitasi mengoksidasi substrat dengan cara mentransfer elektron sehingga menghasilkan molekul fotosensitizer tereduksi. Molekul fotosensitizer tereduksi bereaksi dengan oksigen menghasilkan anion soperoksida radikal. Radikal ini bereaksi dengan oksigen membentuk oksigen reaktif (*Reactive Oxygen Species*), termasuk hidrosil radikal dan hidrogen peroksida melalui reaksi fenton. Hidrosil

radikal mudah berdifusi melalui membran sel dan merusak sel (Astuti, 2011). Reaksi fotokimia tipe II, fotosensitizer keadaan triplet langsung bereaksi dengan oksigen keadaan dasar triplet menyebabkan molekul oksigen tereksitasi dari keadaan triplet ke keadaan oksigen tereksitasi singlet sehingga oksigen singlet dapat bereaksi dengan bahan molekul. oksigen menjadi sitotoksik yang akhirnya bereaksi dengan biomolekul seperti asam nukleat, protein, lipid dan membran. Irradiasi dari sensitiser yang terlokalisasi pada membran menyebabkan membran lisis dan memicu lisisnya sel / organela sehingga mengakibatkan inaktivasi sel yang pada penelitian ini dibuktikan oleh peningkatan persentase reduksi biofilm.

Beberapa penelitian lain terkait fotodinamik pada bakteri fase planktonik maupun biofilm dengan variasi dosis energi serta penambahan fotosensitizer eksogen antara lain; penelitian Astuti *et. al.*, (2016) yang menunjukkan pemaparan laser dioda biru (405 nm) pada jarak 1,5

cm dari target dan waktu paparan 75 detik dengan dosis energi 25 J/cm² serta penambahan klorofil (0,2 mg/ml) sebagai fotosensitizer eksogen dapat mereduksi bakteri *Streptococcus mutant* sebesar 74%. Penelitian Astuti *et. al.*, (2016) efisiensi paparan laser CNC (*Computer Numerical Control*) selama 75 detik dengan penambahan fotosensitizer klorofil dapat mereduksi biofilm *Staphylococcus aureus* sebesar 22,28%. Pada penelitian Heineck *et. al.*, (2015) menunjukkan biofilm *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* dengan penambahan fotosensitizer metilen biru konsentrasi 100 µM yang telah diberi paparan laser dioda merah (665 nm) selama 5 menit dengan dosis energi sebesar 75 J/cm² menghasilkan reduksi sebesar 99,85%. Penelitian sebelumnya menunjukkan persentase reduksi yang berbeda-beda bergantung pada fase bakteri, fotosensitizer, jenis bakteri, dan rapat energinya. Berdasarkan uji viabilitas bakteri, menunjukkan bahwa klorofil tidak bersifat toksik dan tidak mempengaruhi viabilitas bakteri, sedangkan melalui uji antibiofilm dengan metode difusi menunjukkan bahwa fotosensitizer metilen biru memiliki tingkat toksisitas yang rendah. Perbedaan jenis bakteri juga mempengaruhi efektifitas fotodinamik inaktivasi, perbedaan struktural dinding sel antara bakteri gram positif dan negatif, serta perbedaan permeabilitas relatif dari membran bakteri gram positif sebagai fasilitator masuknya fotosensitizer sedangkan membran eksternal kompleks gram negatif bekerja sebagai penghalang masuknya fotosensitizer.

4. Kesimpulan

Paparan menggunakan laser dioda merah (658,00 ± 0,05) nm yang

menginaktivasi metilen biru dalam proses fotoinaktivasi mampu mereduksi biofilm *Staphylococcus aureus*. Perlakuan laser memiliki variasi paparan sebesar (10,96 J/cm²), (21,92 J/cm²), (32,88 J/cm²), (43,84 J/cm²), dan (54,80 J/cm²) sebagai aktifator metilen biru untuk fotoinaktivasi biofilm *Staphylococcus aureus* pada rapat energi 54,80 J/cm² dengan paparan waktu sebesar (300±0,05) detik yang mampu mereduksi biofilm *Staphylococcus aureus* hingga 92,01%

Acknowledgment

The authors gratefully acknowledge the financial funding from Directorate General Higher Education of Indonesia as National Innovations Research Incentive Program Batch I (Gant No. 07/INS-1/PPK/E4/2018).

Referensi

1. Ackerman, P. L. (1988). *Determinants of individual differences during skill acquisition: Cognitive abilities and information processing. Journal of Experimental Psychology: General*, 117(3), 288-318.
2. Astuti, S. D., & Arifianto, D. (2016). Efficacy of CNC-Diode Laser Combine with Chlorophylls to Eliminate *Staphylococcus aureus* Biofilm
3. Astuti, S. D., Zaidan, A., Setiawati, E. M., & Suharningsih. (2016). Chlorophyll mediated photodynamic inactivation of blue laser on *Streptococcus mutans*. *AIP Conference Proceedings*, 1718. <https://doi.org/10.1063/1.4943353>

4. Bevington, Philips R. and Robinson D. Keith. 2003. *Data Reduction And Error Analysis For The Physical Sciences Third Ed.* Americas. New York.
5. Chambers, Henry F. 2001. *The Changing Epidemiology of Staphylococcus Aureus* .7(2):178–82.
6. Csele, Mark. 2004. *Fundamentals of Light Sources and Lasers.* A Jhon Wiley & Sons, Inc.
7. Del, A., Santos, C., Oliveira, D., Santesso, D., Couto, H., Batista, D., Baptista, M. S. (2005). Methylene blue in photodynamic therapy: From basic mechanisms to clinical applications Rozane de F', 1000.
8. Donlan, R. M. (2002). Biofilms : Microbial Life on Surfaces, 8(9), 881–890.
9. Gossweiner, L.I. 2005. *The Science of Phototherapy: An Introduction*, Springer: USA
10. Hamblin, Michael, Massachusetts General Hospital, and Massachusetts General Hospital. 2004. *NIH Public Access.* (June):436–50.
11. Heineck, L., Araujo, R., Mateus, T., Tiemy, I., Cláudio, L., Simões, M., Saba-chujfi, E. (2015). Aggregatibacter actinomycetemcomitans biofilm can be inactivated by methylene blue-mediated photodynamic therapy. *Photodiagnosis and Photodynamic Therapy*, 12(1), 131–135.
<https://doi.org/10.1016/j.pdpdt.2014.10.002>
12. Juzenas P, Juzeniene A, Kaalhus O, Iani V, Moan J. 2002. *Noninvasive fluorescence excitation spectroscopy during application of 5-aminolevulinic acid in vivo.* Department of Biophysics, The Norwegian Radium Hospital, Oslo, Norway.
13. Niemz, Markolf H. 2007. *Laser Tissue Interactions Fundamentals and Application Third Englaged Edition.* Springer : Germany.
14. Nitzan, Y., Shporen, E., & Malik, Z. (2004). ALA induced photodynamic effects on Gram positive and negative bacteria.
15. 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.
16. Parida, P. K., Surianarayanan, G., Alexander, A., Saxena, S. K., & Santhosh, K. (2013). Diode Laser Turbinate Reduction in the Treatment of Symptomatic Inferior Turbinate Hypertrophy. *Indian Journal of Otolaryngology and Head and Neck Surgery*, 65(SUPPL2), 350–355.
<https://doi.org/10.1007/s12070-012-0515-8>
17. Patel, N. B. (2009). Targeted Methylene Blue-Containing Polymeric Nanoparticle Formulations for Oral Antimicrobial Photodynamic Therapy Master ' s Thesis Dissertation Presented By Niraj Patel Advisor : Mansoor M . Amiji , PhD to The Bouve ' Graduate School of Health Sciences , (July), 1–32.
18. Pereira, N. M., Feitosa, L. S., Navarro, R. S., Kozusny-Andreani,

- D. I., & Carvalho, N. M. P. (2018). Use of photodynamic inactivation for in vitro reduction of prevalent bacteria in Fournier's Gangrene. *International Braz J Urol*, 44(1), 150–155.
<https://doi.org/10.1590/S1677-5538.IBJU.2017.0312>
19. Phoenix, D. A. (2003). The phototoxicity of phenothiazinium derivatives against *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus*, 39, 17–22.
[https://doi.org/10.1016/S0928-8244\(03\)00173-1](https://doi.org/10.1016/S0928-8244(03)00173-1)
20. Prasad, Paras N. 2003. *Introduction to Biophotonics*. New Jersey: John Wiley & Son, Inc.
21. Usacheva, M. N., Teichert, M. C., & Biel, M. A. (2001). Comparison of the Methylene Blue and Toluidine Blue Photobactericidal Ef ® cacy Against Gram-Positive and Gram-Negative Microorganisms, 173(February), 165–173.
22. Whang, Thou-jen, Hsien-yu Huang, Mu-tao Hsieh, and Jyun-jen Chen. 2009. "Laser-Induced Silver Nanoparticles on Titanium Oxide for Photocatalytic Degradation of Methylene Blue." 4707–18.