



OPTIMASI PEMBACAAN SPEKTRUM RAMAN PORTABEL UNTUK PEMBACAAN
SPEKTRUM RAMAN PREPARATHISTOLOGI JARINGAN BPH
(BENIGN PROSTATE HYPERPLASIA)

Wirasuta, I.M.A.G.¹, Arimbawa, I.B.S.¹, Yudiasra, I.K.¹, Rashid, M.A.P.P.¹, Purnama,
I.G.P.P.¹, Winarti, N.W.², Laksmiani, N.P.L.¹

¹Jurusan Farmasi Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Universitas Udayana
²Bagian Patologi dan Anatomi RSUP Sanglah Denpasar

Korespondensi: Ida Bagus Sutama Arimbawa

Jurusan Farmasi Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Universitas Udayana
Jalan Kampus Unud-Jimbaran, Jimbaran-Bali, Indonesia 80364 Telp./Fax. 703837

Email: guztams@gmail.com

Abstrak

Optimasi pembacaan spektrum Raman preparat jaringan menggunakan Raman *portable* diperlukan menghindari hasil spektrum yang bias dan mendapatkan spektrum serapan raman sampel biologis yang terbebas dari *noise* pembacaan, yang berakibat pada kesalahan interpretasi pembacaan data serapan/vibrasional gugus-gugus fungsi senyawa kimia penyusun sampel biologi. Tujuan dari penelitian ini adalah untuk mendapatkan metode optimasi pembacaan spektrum raman preparat jaringan yang valid dengan menggunakan Raman *portable*.

Tahapan penelitian meliputi optimasi pengaruh *background*, pengaruh stabilitas penempatan preparat jaringan pada Raman *portable*, pengaruh variasi titik pengukuran, pengaruh variasi *exposure time*, pengaruh variasi *laser power*, dan pengaruh *laser focal probe tip*. Masing –masing spektrum Raman hasil optimasi metode dianalisis dengan metode HCA (*Hierarchical Cluster Analysis*).

Hasil penelitian menunjukkan metode pembacaan spektrum preparat jaringan dengan menggunakan Raman *portable* yang optimal adalah dengan koreksi *background*, pembacaan preparat jaringan sampel dalam kondisi statis, pembacaan dilakukan pada satu titik pengukuran, penggunaan *exposure time* tertinggi yang sama pada setiap pembacaan, penggunaan *laser power* dengan nilai tertinggi yang sama setiap pembacaan, dan penggunaan nilai *laser focal probe tip* yang sama pada setiap pembacaan serta sampel harus berada menepi di depan *probe tip*.

Kata Kunci: Spektrum, Vibrasional, Jaringan, Bias, Valid, Optimasi

1. PENDAHULUAN

Spektroskopi Raman dapat dimanfaatkan untuk membaca spektrum vibrasional komponen kimia penyusun jaringan biologis. Spektrum yang dihasilkan dapat memperlihatkan konstituen molekuler pada jaringan (Moreira *et al.*, 2008). Spektroskopi Raman telah banyak dimanfaatkan untuk analisis jaringan seperti jaringan kulit (Silveira *et al.*, 2012), BPH (*Benign Prostate Hyperplasia*) (Devputra *et al.*, 2010), dan kolon (Wood *et al.*, 2014). Sedangkan penggunaan *Portable Raman Analyzer* (Raman *portable*) biasanya digunakan untuk menganalisis komponen makromolekul, namun mempunyai potensi dalam analisis jaringan biologi untuk keperluan diagnostik.

Raman *portable* (Raman jinjing) dapat dibawa ke lapangan untuk melakukan

pengukuran sampel *in-situ*. Raman *portable* dengan sinar laser 1064 nm memberikan spektrum serapan Raman yang terbebas dari gangguan emisi *fluoresensi* dari gugus fungsi molekuler yang terdapat dalam jaringan biologis (Smith dan Dent, 2005). Pemanfaatan Raman *portable* untuk membaca spektrum molekuler senyawa biologis secara *in-situ* sangat penting untuk keperluan identifikasi sampel forensik, serta identifikasi sampel biologi untuk keperluan diagnostik dll.

Faktor-faktor yang dapat mempengaruhi hasil spektrum Raman menjadi menjadi bias adalah pengaruh *background*, pengaruh stabilitas penempatan preparat jaringan pada Raman *portable*, pengaruh variasi titik pengukuran, pengaruh *exposure time*, pengaruh *laser power* dan pengaruh *laser focal probe tip*. Optimasi pembacaan Raman diperlukan untuk

mendapatkan spektrum serapan Raman sampel biologis yang terbebas dari *noise* pembacaan, yang berakibat pada kesalahan interpretasi pembacaan data serapan/vibrasional gugus-gugus fungsi senyawa kimia penyusun sampel biologi. Pada penelitian ini dilaporkan optimasi pembacaan spektrum raman preparat jaringan menggunakan Raman *portable* untuk mendapatkan spektrum yang valid.

2. BAHAN DAN METODE

2.1 Bahan

Preparat histopatologi jaringan BPH (*Benign Prostate Hyperplasia*) yang diperoleh dari bagian Patologi Anatomi RSUP Sanglah Denpasar

2.2 Alat Penelitian

Alat-Alat pada penelitian ini adalah seperangkat alat spektroskopi Raman *Rigaku FirstGuard™ Portable Raman Analyzer* dengan spesifikasi yaitu sinar dengan panjang gelombang sinar 1064 nm, *laser power* 300 mW, detektor *InGaAs*, rentang spektra 200-2000 cm^{-1} , dan seperangkat komputer dengan program *SpekWin32* dan *Minitab*.

2.3 Prosedur Penelitian

Pembacaan spektrum Raman preparat histologi jaringan BPH (*Benign Prostate Hyperplasia*) dilakukan pada daerah yang telah ditandai oleh dokter patologi sebagai jaringan BPH. Pembacaan spektrum Raman preparat jaringan dilakukan dengan enam kali pengulangan dan dilakukan diluar kuvet.

a) Pengaruh *background*

Pembacaan spektrum raman dilakukan: i) serapan latar gelap (*dark background*) diambil dari serapan udara pada ruang gelap tanpa melakukan *baseline correction*, ii) pembacaan spektrum raman gelas kaca objek tanpa koreksi dari *dark background* dan koreksi *baseline*, dan iii) pembacaan spektrum raman dimana gelas kaca objek dengan preparat jaringan dianggap sebagai *user background* tanpa melakukan koreksi baik *baseline* maupun *dark background*.

b) Pengaruh Stabilitas Penempatan Sampel Preparat Selama Pengukuran.

Pembacaan spektrum Raman dilakukan pada sampel preparat jaringan dengan kondisi statis dan tanpa kondisi statis, setiap pembacaan dilakukan koreksi *darkbackground* dan *baseline*. Kondisi statis yaitu sampel dikondisikan statis tanpa getaran, sedangkan kondisi non statis sampel diperlakukan tidak

statis dan dapat dipengaruhi oleh getaranyaitu dipegang dengan tangan.

c) Pengaruh variabilititas pengukuran.

Pembacaan spektrum Raman preparat jaringan dilakukan pada tiga titik pengukuran. Titik dipilih secara acak dan berada pada daerah penandaan oleh dokter patologi, setiap pembacaan dilakukan koreksi *darkbackground* dan *baseline*.

d) Pengaruh *Exposure Time*

Pembacaan spektrum Raman dilakukan pada satu titik pengukuran dengan variasi *exposure time* 1000 ms, 1500 ms, 2000 ms, 2500 ms, dan 3000 ms, setiap pembacaan dilakukan koreksi *darkbackground* dan *baseline*.

e) Pengaruh *Laser Power*

Pembacaan spektrum Raman dilakukan pada satu titik pengukuran dengan variasi *laser power* 200 mW, 250 mW, 300 mW, 350 mW dan 400 mW, setiap pembacaan dilakukan koreksi *darkbackground* dan *baseline*.

f) Pengaruh *Laser Focal Probe Tip*

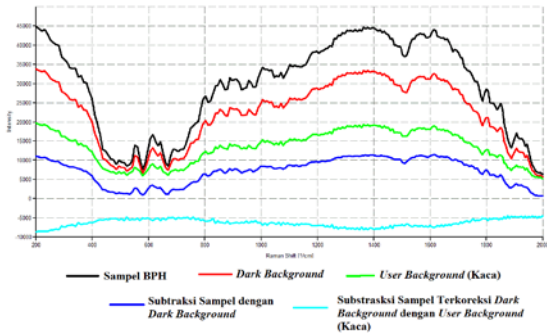
Pembacaan spektrum Raman dilakukan pada satu titik pengukuran dengan variasi *laser probe tip* -1, 0, 1, 2, 3,4,5 dan 6, setiap pembacaan dilakukan koreksi *darkbackground* dan *baseline*

g) Analisis Multivariat

Masing-masing spektrum Raman preparat jaringan yang diperoleh dari hasil optimasi dianalisis dengan metode HCA (*Hierarchical Cluster Analysis*) dengan menggunakan program *Minitab* Analisis *cluster* menggunakan metode *ward*. Variabel dependen adalah bilangan gelombang dan variabel independen adalah intensitas dari masing – masing bilangan gelombang yang dihasilkan pada setiap hasil optimasi pembacaan.

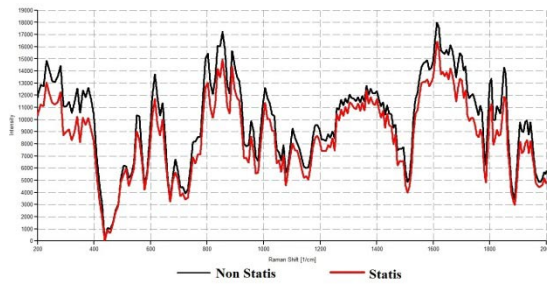
3. HASIL

3.1. Pengaruh Background



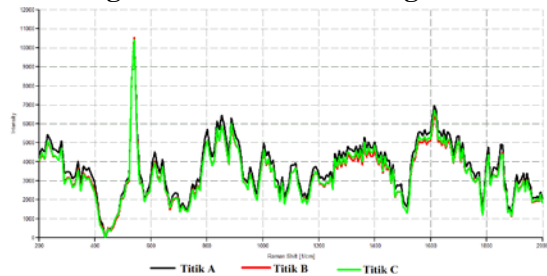
Gambar 1. Spektrum Sampel Jaringan BPH (*Benign Prostate Hyperplasia*), Spektrum *Dark Background*, Spektrum *User Background* (kaca objek), Subtraksi Spektrum Sampel BPH dengan *Dark Background* dan Subtraksi Spektrum Sampel Terkoreksi *Dark Background* dengan *User Background*

3.2. Pengaruh Stabilitas Penempatan Preparat Histologi Jaringan pada Raman Portabel.



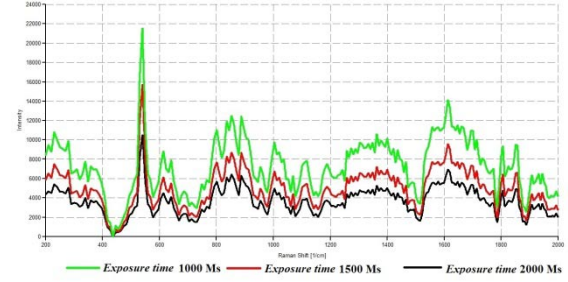
Gambar 2. Hasil Spektra Raman Jaringan BPH (*Benign Prostate Hyperplasia*) dengan Penempatan Kondisi Statis dan Non Statis.

3.3. Pengaruh Variasi Titik Pengukuran



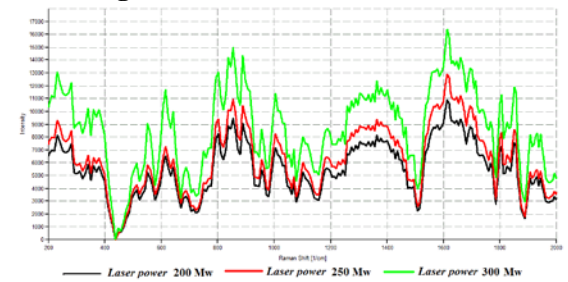
Gambar 3. Hasil spektra Raman jaringan BPH (*Benign Prostate Hyperplasia*) pada variasi titik pengukuran.

3.4. Pengaruh Exposure Time



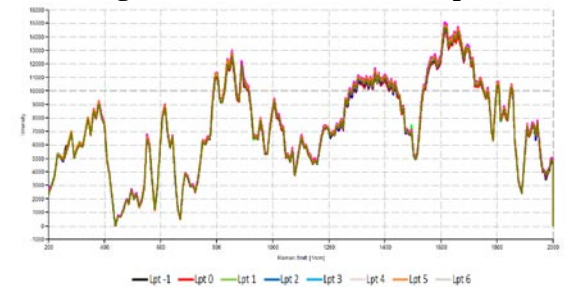
Gambar 4. Hasil spektra Raman preparat jaringan BPH (*benign prostate hyperplasia*) pada variasi *exposure time*.

3.5. Pengaruh Laser Power



Gambar 5. Hasil spektra Raman jaringan BPH (*Benign Prostate Hyperplasia*) pada variasi *laser power*.

3.6. Pengaruh Laser Focal Probe Tip



Gambar 6. Hasil spektra Raman preparat jaringan BPH (*Benign Prostate Hyperplasia*) pada variasi *laser focal probe tip*

Keterangan : (Lpt) = *Laser focal Probe Tip*

3.7. Hasil Nilai *Similarity* Spektrum Preparat Jaringan setiap Optimasi

Tabel 1. Nilai *Similarity* Spektrum

Parameter Optimasi	Nilai <i>Similarity</i> Spektrum (%)
Pengaruh <i>Background</i>	
• Sampel BPH vs Sampel BPH Terkoreksi	77,35
Pengaruh Stabilitas Penempatan Sampel	97,3
Pengaruh Variasi <i>Titik Pengukuran</i>	97,43
Pengaruh Variasi <i>Exposure Time</i>	98,34
Pengaruh Variasi <i>Laser Power</i>	95,12
Pengaruh Variasi <i>Laser Focal Probe Tip</i>	98,30

4 PEMBAHASAN

4.1. Pengaruh *Background*

Spektrum *background* atau *dark background* (gambar 1 pita merah) merupakan spektrum udara dan kelembaban yang selalu berubah setiap hari dan sesuai dengan kondisi lingkungan sehingga diperlukan koreksi *dark background*. ketika dilakukan pembacaan pada hari yang berbeda. Subtraksi Spektrum kaca atau *user background* (gambar 2 pita hijau) dengan spektrum jaringan BPH terkoreksi *dark background* (gambar 1 pita biru) diperlukan untuk mengetahui serapan kaca mampu memberikan serapan. Hasil *subtraction* spektrum kaca (*user background*) terhadap spektrum jaringan BPH terkoreksi *darkbackground* menghasilkan spektrum (gambar 1 pita biru muda) dengan intensitas yang rendah (*minus*) yang menunjukkan kaca preparat tidak memberikan serapan Raman. Pada Raman *portabel* menggunakan sinar NIR dengan panjang gelombang 1064 nm yang tidak menimbulkan serapan pada kaca preparat sehingga yang terbaca pada spektrum kaca preparat tersebut merupakan spektrum *noise* (Dukoer *et al.*, 2006; Wang *et al.*, 2010). Subtraksi spektrum BPH terkoreksi *dark background* (gambar 1 pita biru) menghasilkan spektrum yang identik dengan *background* karena komponen-komponen jaringan yang mampu menyerap sinar Raman seperti protein, lipid, dan asam nukleat dll. menghasilkan vibrasional yang rendah sehingga

puncak serapannya tidak terlihat jelas sehingga diperlukan *correct baseline* untuk memperjelas puncak –puncak spektrum dari jaringan. Nilai *similarity* spektrum jaringan tidak terkoreksi *background* dan spektrum sampel dengan koreksi *background* adalah 77,35% menandakan spektrum sampel dengan pembacaan koreksi *background* dan tanpa koreksi *background* menghasilkan spektrum yang berbeda akibat tidak dilakukan koreksi *dark background*. Dari data yang diperoleh maka pembacaan spektrum harus dilakukan dengan koreksi *dark background* yang selalu berubah-ubah sesuai dengan kondisi lingkungan untuk memperoleh spektrum yang konstan dan dilakukan *correct baseline* pada setiap pengukuran untuk memperjelas puncak spektrum jaringan yang diperoleh.

4.2. Pengaruh Stabilitas Penempatan Sampel Jaringan pada Raman *Portabel*.

Spektrum Raman jaringan dengan pengambilan statis dan non statis memiliki bentuk spektrum Raman yang sama dengan nilai *similarity* 97,3% namun memiliki intensitas yang berbeda (gambar 2). Pembacaan dengan kondisi statis sinar dapat difokuskan pada satu titik pengukuran sehingga diperoleh spektrum dengan intensitas yang konstan, sedangkan pembacaan pada kondisi non statis dapat dipengaruhi getaran sehingga sinar tidak dapat difokuskan pada satu titik pengukuran. Getaran dapat menyebabkan perpindahan titik pengukuran pada sampel jaringan tanpa disadari sehingga hasil pembacaan spektrum yang diperoleh adalah spektrum dari titik pengukuran acak. Pembacaan pada kondisi non statis tidak dapat dilakukan pada preparat dengan konsentrasi molekul jaringan yang berbeda dan berakibat terjadinya perubahan intensitas spektrum. Metode pembacaan tersebut menyebabkan data spektrum menjadi bias akibat spektrum yang diperoleh memiliki intensitas berbeda pada tiap pengukuran akibat titik pengukuran acak. Dapat disimpulkan pembacaan preparat jaringan dengan Raman *portabel* yang optimal adalah pada kondisi statis karena berfokus pada satu titik pengukuran.

4.3. Pengaruh Titik Pengukuran.

Spektrum Raman *jaringan* pada tiga titik pengukuran menghasilkan spektrum yang sama dengan nilai *similarity* 97,43% dan intensitas yang bervariasi pada titik pengukuran yang

berbeda (gambar3). Bentuk spektrum yang sama pada tiga titik pengukuran menunjukkan preparat jaringan memiliki komponen molekul penyusun jaringan yang sama namun memiliki konsentrasi yang berbeda. Yang berakibat variasi intensitas pada titik pengukuran yang berbeda. Variasi titik pengukuran memberikan bentuk spektrum yang sama namun memberikan variasi intensitas pada variasi titik pengukuran sehingga pengambilan spektrum harus dilakukan pada satu titik pengukuran untuk memperoleh spektrum dengan intensitas yang konstan.

4.4. Pengaruh *Exposure Time*.

Variasi *exposure time* memberikan bentuk spektrum yang sama dengan nilai *similarity* 98,34% dan semakin tinggi *exposure time* semakin tinggi intensitas spektrum yang diperoleh (gambar4). Peningkatan *exposure time* mengakibatkan terjadinya peningkatan intensitas spektrum karena semakin lama sampel jaringan dipaparkan sinar maka interaksi antara sinar dengan sampel jaringan semakin optimal. Semakin tinggi *exposure time* juga mengakibatkan semakin optimal rasio SNR (*Signal to Noise*) dan mengurangi *noise* pada spektrum (Lázaro *et al.*, 2009). Pada titik tertentu seiring peningkatan *exposure time* dapat menyebabkan terjadinya kejenuhan pada detektor (*saturated*) sehingga pembacaan spektrum tidak dapat dilakukan dan hal tersebut terjadi pada pembacaan *exposure time* 2500 ms, 3000 ms dan 3500 ms pada penelitian ini. Pembacaan spektrum Raman preparat jaringan dilakukan dengan satu nilai *exposure time* saja dan dipilih nilai *exposure time* terbesar untuk memperoleh spektrum dengan intensitas yang sama serta mengurangi *noise* pada spektrum. Penggunaan dua jenis *exposure time* atau lebih pada waktu pengukuran yang sama tidak dianjurkan karena dapat menyebabkan data spektrum menjadi bias yaitu terjadinya perubahan intensitas pada spektrum.

4.5. Pengaruh *Laser Power*

Variasi laser power menghasilkan bentuk spektrum yang sama dengan nilai *similarity* 95,12% dan intensitas spektrum meningkat seiring dengan meningkatnya *laser power* (gambar 5). Semakin tinggi *laser power* maka semakin tinggi intensitas yang diperoleh karena semakin banyak energi *foton* yang dibiaskan oleh sampel dan dideteksi oleh sampel. Penggunaan *laser power* yang tinggi hingga

batas tertentu dianjurkan untuk memperoleh sinyal intensitas yang optimal. (Rigaku, 2012). Sama halnya dengan *exposure time*, peningkatan kekuatan *laser power* pada titik tertentu menyebabkan detektor mengalami kejenuhan (*saturated*) akibat menerima biasan *foton* melebihi kapasitas dari detektor sehingga pembacaan spektrum pada penggunaan laser power 350 mw dan 400 mw tidak dapat dilakukan. Pembacaan spektrum Raman jaringan biologi dilakukan pada satu nilai *laser power* untuk setiap pengulangannya. Variasi nilai *laser power* pada pengukuran sampel dapat menyebabkan spektrum yang bias dengan intensitas yang berubah-ubah setiap kali pengukuran. Hasil optimal diperoleh dengan menggunakan *laser power* dengan nilai tertinggi untuk memperoleh sinyal intensitas spektrum yang optimal.

4.6. Pengaruh *Laser Focal Probe Tip*

Variasi *Laser focal probe Tip* tidak mempengaruhi bentuk spektrum dengan nilai *similarity* 98,30% dan tidak mengakibatkan perubahan pada intensitas spektrum (gambar 6). *Laser focal probe tip* menyatakan jarak fokus laser pada sampel. Misalnya dengan *laser focal probe tip* -1 menandakan laser difokuskan tepat di depan sampel, *laser focal probe tip* 0 laser difokuskan tepat pada sampel dan seterusnya. Pengukuran tanpa kuvet atau menggunakan *probe tip* dilakukan secara langsung (*in-situ*) pada sampel sehingga dipengaruhi faktor letak sampel (jarak sampel terhadap *probe tip*) yang dapat mempengaruhi intensitas spektrum Raman yang dihasilkan. Pengukuran dengan menggunakan *probe tipe* sampel/medium harus menempel pada *probe tip*. Ketika nilai laser *laser focal probe tip* divariasikan pada pengukuran menyebabkan terjadinya perubahan jarak *probe tip* terhadap sampel preparat jaringan yang menyebabkan terjadinya perubahan intensitas pada spektrum sehingga data spektrum menjadi bias. Variasi perubahan *laser focal probe tip* tidak mempengaruhi bentuk dan intensitas spektrum Raman yang diperoleh namun menyebabkan terjadinya perubahan jarak *probe tip* terhadap sampel sehingga ketika *laser focal probe tip* diubah sampel harus tetap menempel pada *probe tip* untuk mendapatkan spektrum dengan intensitas yang konstan pada setiap pengukuran.

5 KESIMPULAN

Hasil penelitian menunjukkan metode pembacaan spektrum preparat jaringan dengan menggunakan Raman *portabel* yang optimal adalah tanpa koreksi *background*, pembacaan preparat jaringan sampel dalam kondisi statis, pembacaan dilakukan pada satu *spot sampling*, penggunaan *exposure time* yang sama pada setiap pembacaan, penggunaan *laser power* dengan nilai tertinggi, dan penggunaan *laser focal probe tipe* konstan dimana *probe tip* menempel pada sampel tiap pengukuran.

6 UCAPAN TERIMAKASIH

Penulis mengucapkan terimakasih kepada bagian Patologi dan Anatomi RSUP Sanglah Denpasar dan seluruh Tim Analisis Farmasi Universitas Udayana atas bantuan teknis meliputi alat, bahan dan sarana prasarana selama penelitian ini berlangsung.

Vitro Based On the Raman Spectra of Selected Biochemicals. *Journal of Biomedical Optics*, Vo. 17(7), Pp 1-12.

Smith.W.E and G. Dent. 2005. *Modern Raman Spectroscopy – A Practical Approach*. USA : John Wiley & Sons, Ltd.

Wang, W., Zhao, Z., Short, M., and Z. Haishan. 2014. Real-Time in Vivo Cancer Diagnosis Using Raman Spectroscopy. *J. Biophotonics*. Vol. 8(7), Pp 1-19.

Wood, J. J. *et al.* 2014. Evaluation of a Confocal Raman Probe for Pathological Diagnosis During Colonoscopy. *The Association of Coloproctology of Great Britain and Ireland*. Vol. 16. Pp. 732-738.

DAFTAR PUSTAKA

Dukoer, K.R. 2006. *Vibrational Spectroscopy in the Detection of Cancer*. USA: John Wiley & Sons.

Devpura, S., Sarkar, F., Thakur, J., Naik, R., Sthi, S., Naik V.M, Sakr, W. 2010. Detection of Benign Epithelia, Prostatic Intraepithelial Neoplasia, and Cancer Regions in Radical Prostatectomy Tissues Using Raman Spectroscopy. *Vibrational Spectroscopy*. Vol. 53, Pp 227-232.

Lázaro, J.L., M.T.T. Pacheco, K.C. Rodrigues, C.J. Lima, L.M. Moreira, A.B. Villaverde, and L. Silveira. 2009. Optimizing the Raman Signal for Characterizing Organic Samples: The effect of Slit Aperture and Exposure Time. *Spectroscopy*, Vol. 23, Pp. 71–80.

Moreira, L.M., L. Silveira, F.V. Santos, J.P. Lyon, R.Rocha, R.A. Zângaro, A.B. Villaverde, and M.T.T. Pacheco. 2008. Raman Spectroscopy: a Powerful Technique for biochemical analysis and diagnosis. *Spectroscopy*, Volume 22, No. 1, Pp. 1–19.

Rigaku Raman Technologies. 2012. *Xantus™ & FirstGuard™ Handheld Raman Analyzer*. Available from: <https://www.rigakuraman.com>. p. 1-8.

Silveira, L., F.L. Silveira, B.Bodanese, R.A.Zângaro, and M.T.T. Pacheco. 2012. Discriminating Model for Diagnosis of Basal Cell Carcinoma and Melanoma In

