

KARAKTERISASI SIFAT AUTOFLUORESENSI JARINGAN ADENOKARSINOMA MENGGUNAKAN METODE ANALISIS MULTIEKSITASI

Hamdani Zain¹, Aryo Tedjo², Kusmardi³

1. Departemen Fisika Kedokteran, Fakultas Kedokteran, Universitas Indonesia, Jakarta 10430, Indonesia
2. Departemen Kimia Kedokteran, Fakultas Kedokteran, Universitas Indonesia, Jakarta 10430, Indonesia
3. Departemen Patologi Anatomi, Fakultas Kedokteran, Universitas Indonesia, Jakarta 10430, Indonesia

E-mail: h_zain@fk.ui.ac.id

Abstrak

Tujuan umum penelitian ini adalah mendapatkan suatu metode deteksi dini kanker berdasarkan analisis sifat optik antara jaringan normal dan adenokarsinoma menggunakan metode autofluoresensi multieksitasi. Pengamatan sifat autofluoresensi jaringan dilakukan pada sampel biopsi seksi jaringan adenokarsinoma, sampel mencit GR yang ditransplantasi adenokarsinoma, dan kultur sel SM 1. Eksitasi jaringan dilakukan menggunakan lampu *Light Emitting Diode* (LED) pada beberapa kisaran panjang gelombang cahaya tampak. Pada penelitian ini diperoleh data bahwa nilai intensitas autofluoresensi (IAF) pada kisaran panjang gelombang merah dari sel dan jaringan adenokarsinoma cenderung lebih rendah dibandingkan dengan jaringan normal jika dieksitasi oleh LED biru. Sebaliknya nilai IAF pada panjang gelombang infra merah dari sel dan jaringan karsinoma cenderung lebih tinggi dibandingkan dengan jaringan normal apabila dieksitasi oleh LED merah.

Abstract

Characterization of Adenocarcinoma's Autofluorescence Properties Using Multiexcitation Analysis Method. General purpose of this research is to get an early cancer detection method based on the properties of optical analysis between normal and adenocarcinoma tissue using the multiexcitation autofluorescence method. Observation of autofluorescence properties was done on the biopsy sample of adenocarcinoma tissues, GR mice transplanted by adenocarcinoma, and cell culture SM 1. Excitation on tissue was done by using the lamp Light Emitting Diode (LED) at some visible light wavelength range. This research obtained that the value of Intensity Auto fluorescence (IAF) at range red wavelength of cells and adenocarcinoma tissues tend to lower compared to the cells normal tissues if its were excited by blue LED. On the contrary, the value of IAF at infra red wavelength from cells and carcinoma tissues tend to higher compared to the cells and normal tissues if its were excited by red LED.

Keywords: Autofluorescence, Light Emitting Diode, multiexcitation, adenocarcinoma

1. Pendahuluan

Kanker merupakan penyakit penyebab kematian terbesar kedua di dunia. Dalam laporan yang dikeluarkan oleh *The American Cancer Society* pada tahun 2002, terdapat 1,3 juta penderita kanker baru di Amerika dan hampir 50% dari seluruh kasus mengalami kematian karena kanker¹. Data kejadian kanker di Indonesia menunjukkan bahwa terdapat 100 orang yang didiagnosis terkena kanker untuk setiap 100 ribu orang Indonesia setiap tahunnya². Sedangkan menurut Suvei Kesehatan Rumah Tangga (SKRT) tahun 2002, kanker merupakan penyebab kematian nomor tiga di Indonesia setelah penyakit jantung dan stroke³.

Kebanyakan kanker dapat disembuhkan, terutama bila perawatan dimulai sejak dini. Umumnya kanker dikenali bila tanda atau gejala telah tampak, dan ini seringkali terjadi ketika kanker berada pada stadium yang telah lanjut. Seperti pada kanker paru, pada saat awal ketika pasien didiagnosis terkena kanker paru, hasil diagnosis menunjukkan bahwa 20% pasien memiliki kanker yang terlokalisir, 25% memiliki metastasis regional, dan 55% telah memiliki kanker yang telah menyebar jauh⁴.

Di Indonesia, kasus keterlambatan penanganan dini kanker selain diakibatkan karena rendahnya pengetahuan dan kesadaran masyarakat tentang pemeriksaan kesehatan, juga disebabkan tidak semua pelayanan kesehatan tingkat pertama (puskesmas) memiliki alat diagnostik kanker yang memadai. Umumnya alat diagnostik kanker yang memadai hanya dijumpai di rumah sakit, sehingga seringkali pasien baru diketahui menderita kanker setelah dirujuk ke rumah sakit. Padahal data yang ada di Rumah Sakit Cipto Mangunkusumo (RSCM) menunjukkan dari keseluruhan pasien kanker yang dirujuk, 65 % diantaranya didiagnosis menderita kanker pada stadium yang telah lanjut⁵. Atas dasar itu, pengembangan metode diagnosis dini kanker yang mudah, sederhana, dan cepat, namun akurat, sudah semestinya menjadi sesuatu yang perlu dan berprioritas tinggi.

Saat ini metode diagnosis dan terapi kanker juga diarahkan pada pendekatan yang bersifat noninvasif atau tanpa merusak jaringan normal di sekitarnya. Analisis patologi jaringan yang memerlukan sediaan biopsi dan diagnosis kanker menggunakan sumber energi tinggi atau frekuensi tinggi seperti MRI, rontgen, ultrasonik, dan tomografi sinar-x mulai diberikan alternatif metode yang lebih noninvasif dan bersifat nondestruktif seperti teknik spektroskopi optik.

Salah satu jenis spektroskopi optik yang banyak digunakan untuk diagnosis kanker adalah spektroskopi fluoresensi. Pada berbagai literatur diketahui spektroskopi fluoresensi diketahui dapat dengan cepat membedakan jaringan normal dan tumor dari berbagai organ berepitel⁶. Namun demikian, meski teknik ini diketahui memiliki sensitivitas yang tinggi dalam mendeteksi jaringan tumor, spesifitas yang dihasilkan dalam membedakan jaringan tumor dan normal pada tahap awal terjadinya tumor masih cukup rendah⁷. Hal menjadi kendala dalam penerapan teknik spektroskopi fluoresensi sebagai alat diagnostik dini untuk tumor.

Rendahnya spesifitas salah satunya dapat terjadi karena pengamatan spektrum fluoresens jaringan biasanya dilakukan hanya pada satu kisaran panjang gelombang eksitasi. Padahal proses patogenesis dan metastasis karsinoma merupakan suatu proses dengan banyak tahap dan dikontrol oleh banyak gen dan banyak faktor lainnya serta melibatkan banyak senyawa. Oleh karena itu, metode spektroskopi fluoresens yang menggunakan beberapa kisaran panjang gelombang eksitasi atau multieksitasi merupakan metode yang dapat dikembangkan sebagai dasar klasifikasi jaringan.

2. Metode Penelitian

Masalah yang akan diteliti adalah perbedaan energi emisi fluoresens antara jaringan normal dan karsinoma pada beberapa kisaran panjang gelombang eksitasi. Antara jaringan normal dan karsinoma diharapkan lebih dapat dibedakan secara signifikan dengan autofluoresensi multieksitasi karena spesifitas jaringan secara keseluruhan akan ditentukan oleh puncak-puncak intensitas spesifik yang muncul pada spektrum emisi fluoresensi dari setiap fluorofor alami yang tereksitasi. Analisis data dari intensitas emisi fluoresensi yang dihasilkan dari kedua jaringan kemudian dijadikan sebagai dasar klasifikasi.

Sampel yang digunakan pada penelitian ini berupa seksi jaringan beku yang dibiopsi dari tumor kelenjar susu (adenokarsinoma) mencit GR, mencit GR yang ditransplantasi adenokarsinoma, dan kultur lestari sel SM 1 yaitu suatu sel karsinoma payudara pada manusia. Semua sampel yang diuji telah dilakukan pemeriksaan secara histopatologi di Departemen Patologi Anatomi, Fakultas Kedokteran Universitas Indonesia (FKUI).

Pengukuran nilai intensitas autofluoresensi (IAF) dilakukan menggunakan alat spektrofotometer sederhana yang dibuat dari otoskop yang telah dimodifikasi. Sumber cahaya eksitasi yang digunakan berupa lampu LED (*Light Emitting Diode*). Energi emisi fluoresensi yang dihasilkan ditangkap menggunakan sensor LDR yang bekerja pada panjang gelombang cahaya tampak (400-700 nm), dan sensor infra merah (IR) yang bekerja pada panjang gelombang di atas 700 nm.

Penelitian ini dilakukan di Departemen Fisika Kedokteran dan Departemen Patologi Anatomi FKUI dari bulan Oktober 2006 sampai dengan bulan September 2007.

Pengukuran intensitas emisi fluoresensi pada seksi jaringan (*tissue section*) dilakukan dengan menggunakan sampel biopsi jaringan normal dan tumor kelenjar susu dari mencit GR yang telah ditransplantasi oleh sel tumor. Jaringan dipotong tipis pada tiga posisi dalam kondisi beku dengan ketebalan 25 μm -5 mm dan diletakkan pada kaca preparat untuk kemudian dilakukan pengukuran intensitas emisi fluoresensi antara jaringan normal dan karsinoma pada beberapa kisaran panjang gelombang eksitasi pada daerah cahaya tampak. Dilakukan juga analisis secara histopatologis pada jaringan tersebut untuk membandingkan hasil yang diperoleh.

Pengukuran intensitas emisi fluoresensi dilakukan pada mencit GR yang ditransplantasi adenokarsinoma pada jaringan yang sakit dan jaringan normal di sekitarnya. Pengukuran intensitas emisi fluoresensi dilakukan pada daerah cahaya tampak menggunakan beberapa kisaran panjang gelombang eksitasi.

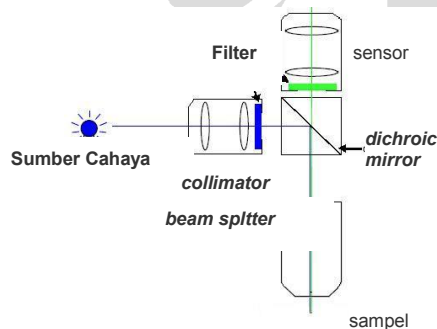
Pengukuran intensitas emisi fluoresensi pada kultur sel SM 1 dilakukan pada hari ke 0, hari ke 1, hari ke 3, dan hari ke 5 menggunakan beberapa kisaran panjang gelombang eksitasi pada daerah cahaya tampak. Hasil pengukuran kemudian dibandingkan dengan pengukuran pada kultur sel payudara yang sehat (normal).

3. Hasil dan Pembahasan

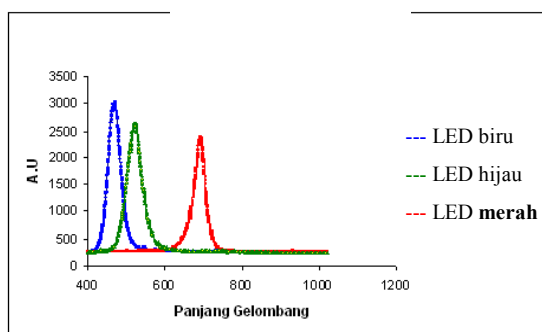
Pada penelitian ini langkah pertama yang dilakukan adalah melakukan kalibrasi dan validasi instrument. Tahapan yang dilakukan dalam kalibrasi dan validasi instrument meliputi karakterisasi sumber cahaya, sensor, dan filter yang akan digunakan.

Cahaya dikirim ke sample melalui *beam splitter*, pantulannya melalui *beam splitter* ditangkap sensor, sebagaimana diperlihatkan pada Gambar 1.

Pantulan yang dihasilkan juga memiliki spektrum tergantung obyek yang digunakan yang antara lain dapat berupa cahaya refleksi, fluoresensi, dan hamburan. Sumber cahaya yang dikarakterisasi adalah cahaya yang bersumber dari lampu dioda (LED). Hasil karakterisasi sumber cahaya dari LED biru, hijau, dan merah, dapat dilihat pada Gambar 2.



Gambar 1. Instrumen deteksi cahaya fluoresens



Gambar 2. Spektrum absorpsi beberapa LED

Pada Gambar 2 dapat dilihat bahwa sumber cahaya yang digunakan memiliki spektrum serapan yang masih cukup lebar yaitu untuk LED biru pada kisaran panjang gelombang 420-520 nm, LED hijau pada kisaran panjang gelombang 450-600 nm, dan untuk LED merah pada kisaran panjang gelombang 620-740 nm.

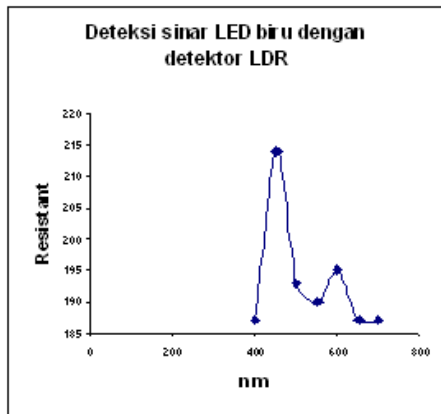
Berdasarkan studi literatur seperti yang terdapat pada Tabel 1 diketahui bahwa beberapa fluorofor intrinsik yang dapat dieksitasi pada kisaran panjang gelombang dari LED biru adalah senyawa *porphyrin*, fosfolipid, dan senyawa flavin. Sedangkan LED merah digunakan untuk mengeksitasi fluorofor nonspesifik yang energi emisinya muncul pada daerah inframerah dekat (NIR). Energi emisi ini diketahui muncul pada beberapa karsinoma *insitu* (CIS) dari beberapa jenis jaringan, seperti pada jaringan mukosa bronkus⁹.

Sensor yang digunakan pada alat pengukuran intensitas emisi fluoresensi adalah sensor LDR dan sensor IR. Dari spektrum pada Gambar 3 dapat dilihat bahwa sensor LDR yang digunakan memiliki spektrum yang luas. Hal ini berarti sensor LDR dapat menangkap semua cahaya yang dipantulkan obyek pada kisaran daerah spektrum cahaya tampak (VIS) dengan cukup baik sehingga dapat digunakan untuk menangkap energi emisi fluoresensi yang dipancarkan pada daerah VIS. Selain sensor LDR, pada penelitian ini digunakan juga sensor IR. Sensor IR akan spesifik menangkap energi emisi fluoresensi hanya pada daerah inframerah.

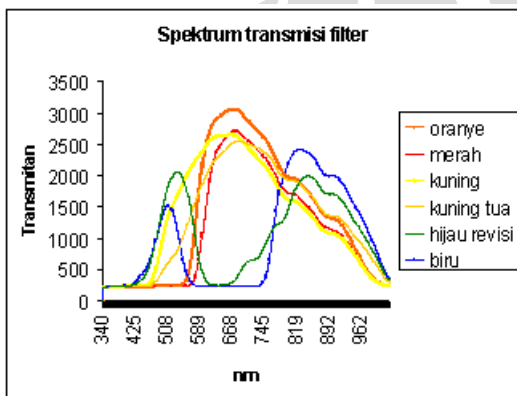
Untuk menjamin bahwa yang ditangkap sensor benar-benar merupakan spektrum emisi fluoresensi dari suatu obyek yang dieksitasi, perlu dipasang filter di depan sensor yang sesuai dengan sifat autofluoresensinya. Hasil karakterisasi dari beberapa filter yang akan digunakan dapat dilihat pada Gambar 4.

Tabel 1. Panjang gelombang eksitasi dan emisi beberapa fluorofor endogen⁸

Fluorofor endogen	Eksitasi maks (nm)	Emisi maks (nm)
Asam amino		
Triptofan	280	350
Tirosin	275	300
Fenilalanin	280	280
Protein structural		
Kolagen	325, 350	400, 405
Elastin	290, 325	340, 400
Enzim & koenzim		
FAD, flavin	450	535
NADH	290, 351	440, 460
NADPH	336	464
Lipid		
Fosfolipid	436	540, 560
Lipofuscin	340-395	540, 460
Ceroid	340-395	460, 540
Porphyrin	400-450	630, 690



Gambar 3. Responsivitas LDR dalam menangkap sinar dari LED biru



Gambar 4. Spektrum transmisi dari beberapa filter

Berdasarkan hasil karakterisasi dari beberapa filter diketahui bahwa filter merah akan meneruskan cahaya pada kisaran panjang gelombang 570 – 900 nm. Ini berarti filter merah bersama dengan sensor LDR dapat digunakan untuk menangkap energi emisi fluoresensi dari senyawa *porphyrin* (panjang gelombang emisi 630 dan 690 nm) yang dieksitasi oleh LED biru. Sedangkan filter hijau (meneruskan cahaya pada 430-600 nm) bersama dengan sensor LDR dapat digunakan untuk menangkap energi emisi fluoresensi dari senyawa fosfolipid (panjang gelombang emisi 540 nm dan 560 nm) dan senyawa flavin (panjang gelombang emisi 535 nm).

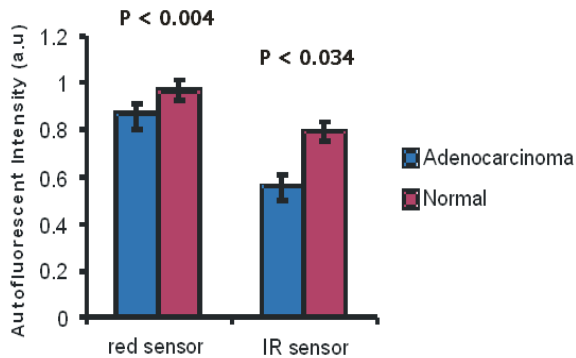
Dari hasil karakterisasi terhadap sumber cahaya, sensor, dan filter dapat diketahui bahwa pengukuran energi emisi autofluoresensi senyawa *porphyrin* dilakukan dengan menggunakan sumber cahaya LED biru, sensor LDR, dan filter merah. Untuk senyawa fosfolipid dan flavin pengukuran energi emisi autofluoresensi dapat dilakukan dengan menggunakan sumber cahaya LED biru, sensor LDR, dan filter hijau. Sedangkan LED merah dan sensor IR digunakan untuk mengeksitasi fluorofor nonspesifik yang energi emisinya muncul pada daerah inframerah dekat (NIR).

Hasil pengukuran energi emisi fluoresensi sampel biopsi jaringan normal dan adenokarsinoma dari mencit GR yang diletakan pada kaca preparat dapat dilihat pada Gambar 5 dan Gambar 6.

Pada Gambar 5 dapat dilihat bahwa nilai intensitas autofluoresensi (IAF) pada seksi jaringan adenokarsinoma lebih kecil dibandingkan dengan jaringan normal, ketika kedua jaringan dieksitasi LED biru. Dari hasil analisis regresi linear univariat (ANOVA) diketahui bahwa jaringan normal dan adenokarsinoma ($n=9$) dapat dibedakan secara nyata ketika dieksitasi oleh LED biru, baik dengan menggunakan sensor LDR ($P=0.004$) maupun sensor IR ($P=0.034$)

Hasil eksitasi jaringan menggunakan LED merah dan laser merah dapat dilihat pada Gambar 6. Pada Gambar 6 dapat dilihat bahwa nilai intensitas autofluoresensi (IAF) pada seksi jaringan adenokarsinoma lebih besar dibandingkan

dengan jaringan normal, baik ketika kedua jaringan dieksitasi dengan LED merah maupun dengan laser merah. Fenomena ini ditemukan juga pada penelitian yang dilakukan oleh Zellweger *et al*⁹ ketika mengamati spektrum emisi jaringan normal dan neoplasia pada mukosa bronkus. Pada penelitian tersebut diketahui bahwa nilai IAF jaringan yang sakit cenderung lebih rendah dibandingkan dengan nilai IAF jaringan sehat disekitarnya pada kisaran panjang gelombang 400-680 nm. Namun demikian, pada daerah 680-800 nm (merah sampai dengan inframerah) ditemukan kondisi sebaliknya dimana nilai IAF jaringan yang sakit cenderung lebih tinggi dibandingkan dengan nilai IAF jaringan sehat. Kondisi ini ditemukan pada jaringan yang sudah mengalami transformasi kearah displasia dan karsinoma *insitu* (CIS). Berdasarkan penelitian tersebut dapat disimpulkan bahwa semakin tinggi nilai IAF

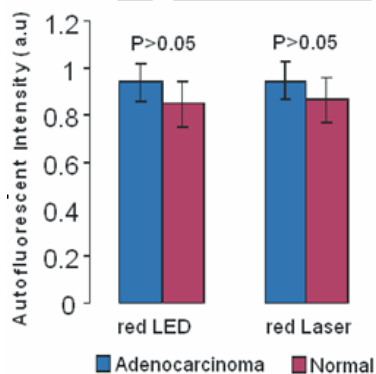


Gambar 5. Nilai rerata intensitas energi emisi autofluoresensi (IAF) jaringan normal dan adenokarsinoma ketika dieksitasi oleh LED biru (n=9)

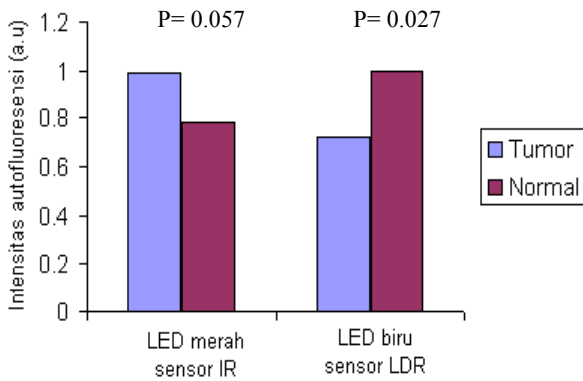
jaringan pada daerah inframerah, semakin tinggi tingkatan (stadium) transformasi yang mengarah pada terbentuknya jaringan kanker.

Hasil pengukuran energi emisi fluorosensi adenokarsinoma dengan jaringan normal di sekitarnya pada mencit GR secara *in vivo* dapat dilihat pada Gambar 7.

Hasil pengukuran nilai IAF menggunakan LED biru-sensor LDR menunjukkan kecenderungan yang sama dengan pengukuran pada preparat jaringan, yaitu nilai IAF pada adenokarsinoma lebih rendah dibandingkan dengan jaringan normal di sekitarnya. Pengukuran menggunakan LED merah-sensor IR juga menunjukkan kecenderungan yang sama dengan pengukuran pada preparat jaringan, yaitu nilai IAF yang dihasilkan pada adenokarsinoma lebih tinggi dibandingkan dengan jaringan normal di sekitarnya.



Gambar 6. Nilai rerata IAF pada daerah infra merah pada jaringan normal dan adenokarsinoma ketika dieksitasi oleh LED merah dan laser merah (n=9)



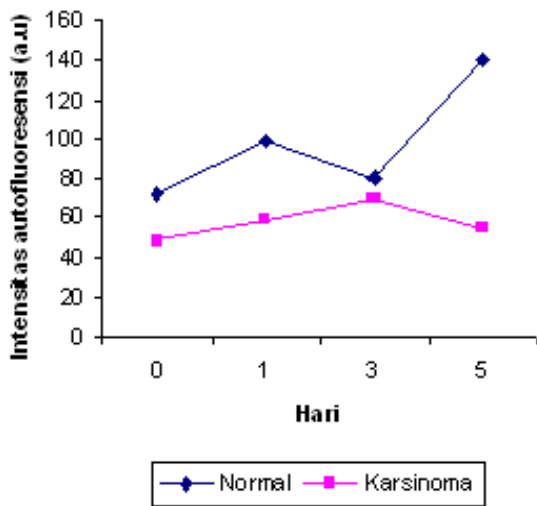
Gambar 7. Nilai rerata IAF jaringan normal dan adenokarsinoma ketika dieksitasi oleh LED merah-sensor IR dan LED biru-sensor LDR (n=6).

Hasil uji hasil analisis regresi linear univariat (ANOVA) menunjukkan bahwa tidak terdapat perbedaan yang nyata di antara jaringan adenokarsinoma dengan jaringan normal sekitarnya apabila pengukuran dilakukan menggunakan LED merah-sensor IR (P=0.057). Sedangkan apabila pengukuran dilakukan menggunakan LED biru-sensor LDR dihasilkan perbedaan yang nyata (P=0.027) di antara kedua jaringan.

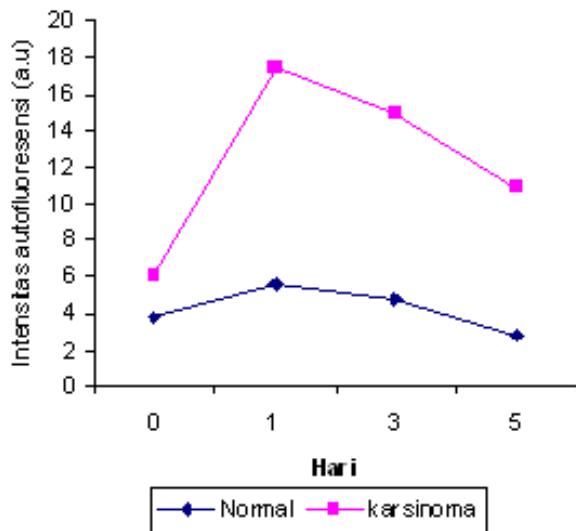
Hasil uji MANOVA menunjukkan bahwa jika pengukuran dilakukan secara multieksitasi menggunakan LED biru dan LED merah akan terdapat perbedaan nilai IAF yang nyata (P=0.036) di antara kedua jaringan. Dari hasil analisis pada seksi jaringan dan hewan model dapat disimpulkan bahwa teknik autofluoresensi multieksitasi lebih dapat mengklasifikasikan jaringan dibandingkan dengan hanya menggunakan satu kisaran panjang gelombang eksitasi saja.

Dari pengukuran intensitas emisi fluoresensi pada kultur sel terlihat nilai IAF yang dihasilkan memiliki kecenderungan yang sama seperti pengukuran hewan coba maupun pada seksi jaringan. Pada Gambar 8 terlihat bahwa nilai IAF pada sel karsinoma (sel SM 1) memiliki kecenderungan lebih kecil dibandingkan sel normal bila diukur menggunakan LED biru-sensor LDR. Sedangkan bila pengukuran dilakukan menggunakan LED merah-sensor IR terlihat hasil yang sebaliknya dimana nilai IAF pada sel karsinoma memiliki kecenderungan lebih besar dibandingkan sel normal (Gambar 9).

Dari kedua Gambar 8 dan Gambar 9 tidak terlihat adanya kecenderungan peningkatan atau penurunan nilai IAF terhadap meningkatnya umur sel. Dari hasil



Gambar 8. Nilai rerata IAF kultur sel SM 1 dan kultur sel payudara normal ketika dieksitasi oleh LED biru (n=4)



Gambar 9. Nilai rerata IAF kultur sel SM 1 dan kultur sel payudara normal ketika dieksitasi oleh LED merah (n=4)

uji regresi linear univariat (ANOVA) juga diketahui bahwa pengaruh umur sel tidak memberikan perbedaan yang nyata terhadap nilai IAF baik pada kultur sel SM 1 maupun kultur sel payudara normal ($P > 0.05$). Namun demikian, LED merah-sensor IR mampu membedakan kultur sel SM 1 dan kultur sel payudara normal secara nyata ($P = 0.035$) sedangkan penggunaan LED biru-sensor merah tidak dapat membedakan kedua sel secara nyata ($P = 0.057$).

Dari hasil pengukuran intensitas emisi fluoresensi pada kultur sel dapat disimpulkan bahwa perubahan transformasi sel terhadap bertambahnya umur sel kurang dapat diamati pada kultur sel. Hal ini mungkin terjadi karena panjang gelombang eksitasi dan emisi yang digunakan kurang dapat mendeteksi fluorofor intrinsik dominan yang terdapat pada kultur sel. Pada penelitian sebelumnya yang dilakukan oleh Pradhan *et al*¹⁰ diketahui fluorofor intrinsik seperti NADH dan triptofan akan meningkat konsentrasinya seiring dengan meningkatnya transformasi sel dari kondisi nonmetastatik ke arah metastatik. Dalam pengembangan alat selanjutnya akan dicoba penggunaan lampu UV untuk mengeksitasi kedua fluorofor tersebut. Hal ini perlu dilakukan karena panjang gelombang eksitasi untuk kedua fluorofor tersebut berada pada daerah UV, yaitu pada panjang gelombang 280 nm untuk triptofan, serta 290 nm dan 351 nm untuk NADH.

4. Kesimpulan

Pada penelitian ini diketahui bahwa LED biru, LED merah, dan laser merah dapat digunakan sebagai sumber energi untuk mengeksitasi sel atau jaringan. Fluorofor intrinsik yang dapat dieksitasi dengan LED biru adalah senyawa *phorpyrin* yang memiliki panjang gelombang emisi fluoresensi pada daerah merah (630-690 nm). Penggunaan LED biru-sensor LDR diketahui dapat membedakan adenokarsinoma dengan jaringan normal di sekitarnya dengan nyata, baik pada sampel seksi jaringan maupun pada sampel hewan coba. Sebaliknya penggunaan LED merah-sensor IR dan laser merah-sensor IR tidak dapat membedakan kedua sampel tersebut dengan nyata. Namun demikian berdasarkan uji MANOVA diketahui bahwa jaringan karsinoma dan jaringan normal di sekitarnya dapat dibedakan dengan nyata apabila LED biru-sensor LDR, dan LED merah-sensor IR digunakan secara bersama-sama.

Pada penelitian ini juga diperoleh data bahwa nilai IAF pada panjang gelombang merah dari sel/jaringan karsinoma cenderung lebih rendah dibandingkan dengan jaringan normal apabila sel atau jaringan tersebut dieksitasi oleh LED biru. Sebaliknya nilai IAF pada panjang gelombang infra merah dari sel dan jaringan karsinoma cenderung lebih tinggi dibandingkan dengan jaringan normal apabila sel atau jaringan tersebut dieksitasi oleh LED merah.

Dari pengukuran nilai IAF pada sampel kultur sel diketahui bahwa tidak terdapat kecenderungan penurunan atau peningkatan nilai IAF terhadap meningkatnya umur sel. Untuk itu diperlukan tambahan panjang gelombang eksitasi pada daerah UV untuk memperbanyak jumlah fluorofor intrinsik yang tereksitasi.

Daftar Acuan

1. Adiyono W. Oleh-oleh Medis dari World Congress Oncology II. <http://www.suaramerdeka.com/harian/0411/08/ragam1.htm>. 2004.
2. Reksodipuro AH. *Kanker sebagai Masalah Kesehatan, Konsep Pendekatan Diagnostik dan Penatalaksanaan. (Cancer as Health Problem, A Concept on Diagnostic and Management Approach)*. Jakarta: Fakultas Kedokteran Universitas Indonesia, 1996.
3. DepKes RI-Balitbangkes. *Survei Kesehatan Rumah Tangga (SKRT) 2002*. Jakarta: DepKes RI, Badan Penelitian dan Pengembangan Kesehatan, 2002.
4. Porello PT, Peredy T. Lung Neoplasms. <http://www.emedicine.com/articles.html>. 2006.
5. Siswono. 65% Pasien Kanker Terlambat Berobat. <http://www.gizi.net/cgi-bin/berita/fullnews.cgi>. 2006.
6. Tara M, Breslin, Fushen Xu, Gregory M. Palmer, Changfang Zhu, Kennedy W. Gilchrist, and Nirmala Ramanujam.. Autofluorescence and Diffuse Reflectance Properties of Malignant and Benign Breast Tissues. *Annals of Surgical Oncology* 2003; 11(1) : 6570.
7. Zavadil L, Lezala D, Horakb L, Duchacb V, Prochazkac M.. Autofluorescence spectroscopy of malignant tissue. *J. Optoelectronics and Adv. Materials* 2005 ; 7(2) :1023 – 1028.
8. D. Zaak, E. Hungerhuber, P. Schneede, H. Stepp, D. Frimberger, S. Corvin, N. Schmeller, M. Kriegmair, A. Hofstetter and R. Knöchel. Role of 5-aminolevulinic acid in the detection of urothelial premalignant lesions. *Cancer* 2002; 95(6):1234-1238.
9. Zellweger M, P. Grosjean, D. Goujon, P. Monnier, H. van den Bergh and G. Wagnières, In vivo autofluorescence spectroscopy of human bronchial tissue to optimize the detection and imaging of earlycancers, *J Biomed Optics* 2001; 6(1):41-51.
10. Pradhan A, Pal P, Duocher G, Villeneuve L, Balassy A, Babai F, Gaboury L, Blanchard L. Steady state and time resolve fluorescence properties of metastatic and nonmetastatic malignant cell from different species. *J. Photochem Photobiol B: Biol* 1995; 31 (3): 101-102.