

BAB VI

PEMBAHASAN

Apoptosis merupakan kematian sel terprogram dan merupakan salah satu dampak adanya kerusakan DNA yang dapat diinduksi oleh radiasi ionisasi. Regulator utamapada ketiga fase apoptosis adalah suatu kelompok enzim protease yakni *Cystein Aspartyl-specific Proteases (caspase)*. Pada mamalia terdapat 14 jenis teridentifikasi dan caspase-3 adalah salah satu yang berperan sebagai caspase efektor/eksekusioner. Caspase-3 bekerja pada fase eksekusi, di mana apoptosis mencapai tahap akhir dan sel memperlihatkan karakteristik biokimiawi dan morfologi apoptosis. Maka dari itu, pada penelitian ini, caspase-3 digunakan sebagai parameter identifikasi sel yang mengalami apoptosis karena caspase-3 adalah indikator paling *reliable* (Lee et.al., 2003). Sel yang mengekspresikan caspase-3 dikenali sebagai sel yang memperlihatkan warna coklat pada sitoplasma, sesuai dengan lokalisasi protease tersebut (Bressenot, et.al, 2009).

Integritas DNA merupakan elemen penting demi kelangsungan hidup sel dan reproduksi, untuk itu informasi genetik dalam DNA harus memperoleh proteksi. Proteksi tersebut meliputi (1) sistem replikasi yang sangat akurat oleh mekanisme *proofreading* dan (2) sistem perbaikan DNA yang mengalami kerusakan. DNA merupakan satu-satunya molekul yang apabila rusak dapat diperbaiki oleh sel (Garett dan Grisham, 2005).

Kerusakan DNA mengaktivasi protein p53, protein yang berperan sebagai pengontrol negatif pertumbuhan yang dominan dan memiliki peran aktif dalam mendeteksi kerusakan DNA, dan menginduksi reparasi DNA serta menginduksi apoptosis. Aktivasi p53 menyebabkan terhentinya siklus sel pada *checkpoints*. *Checkpoints* adalah istirahat dari siklus sel untuk menjamin bahwa DNA berduplikasi dengan akurat dan separasi dari kromosom terjadi dengan benar. Kontrol pertama terdapat pada fase G1 (disebut dengan *G1 arrest*), yang memperkenankan sel untuk memasuki fase sintesis DNA sedangkan yang kedua adalah pada fase G2 (disebut dengan *G2 arrest*), yang menguji kelayakan sel untuk dapat menjalani mitosis.

Dalam keadaan normal aktivasi gen p53 terjadi apabila ada kerusakan DNA dan dengan terhentinya siklus sel terdapat kesempatan perbaikan/reparasi DNA yang rusak sebelum siklus sel memasuki fase S atau fase replikasi DNA. Apabila kerusakan DNA melebihi kemampuan sel untuk memperbaikinya, maka akumulasi kesalahan pada sel dapat menyebabkan terjadinya penuaan dini, apoptosis, dan kanker. Namun, saat ini diketahui juga bahwa aktivasi p53 akibat kerusakan DNA akan mengakibatkan juga kematian sel terprogram (apoptosis) lebih banyak daripada *G1 arrest* (Kastan BM, 1997).

Kerusakan DNA dapat diinduksi oleh faktor endogen maupun eksogen. Faktor endogen mencakup produk metabolit sampingan, terutama dari proses deaminasi oksidatif seperti ROS (*reactive oxygen species*). Sementara itu, faktor eksogen merupakan berbagai faktor yang berasal dari luar tubuh seperti radiasi (ultraviolet dari cahaya matahari, radiasi sinar-X, dan sinar gamma), toksin tumbuhan tertentu, serta senyawa kimia mutagenik (Bartek dan Lukas, 2007).

Radiasi ionisasi merupakan agen sitotoksik yang menyebabkan kerusakan untai ganda DNA (Zhou, *et.al*, 1998). Kerusakan untai ganda DNA ini dideteksi oleh protein ATM (*Ataxia Telangiectasia Mutated*) (Bakkenist dan Kastan, 2013). Sensitivitas sel terhadap radiasi tergantung pada fase sel dalam siklus proliferasi. Sel dalam fase G2 dan M (mitosis) lebih sensitif terhadap radiasi dibandingkan dengan fase G1 dan S (sintesis DNA) (Mitchell, 2006).

Radiasi sinar gamma yang diberikan pada penelitian ini berasal dari emitor sinar gamma berbasis radioisotop cobalt-60 dan menggunakan 2 macam dosis radiasi berbeda, yakni dosis tunggal 10 Gy dan dosis fraksinasi 2 Gy selama 5 hari berturut-turut (dosis total 10 Gy). Pemberian 2 macam dosis yang berbeda ini bertujuan untuk mengetahui perbedaan efek kedua macam dosis radiasi terhadap apoptosis sel epitel kolon hewan coba berdasarkan pada ekspresi caspase-3. Dosis 10 Gy dipilih karena dosis ini merupakan dosis sedang (*moderate dose*), di mana sel tetap mampu mempertahankan fungsi normalnya, termasuk proliferasi sel, setelah penyinaran diberikan (Coleman, 2003). Dosis fraksinasi sebesar 2 Gy diberikan setiap hari selama 5 hari sesuai dengan rekomendasi *U.S. Conventional Fractionation* yakni terapi radiasi untuk keganasan diberikan dalam dosis harian sebesar 1,8-2 Gy/hari selama 5 hari berturut-turut selama 5-7 minggu (Schreiber, 2013). Kolon hewan coba diambil melalui pembedahan pada 17-24 jam setelah pemberian radiasi sinar gamma. Hal ini sesuai dengan teori yang menyatakan bahwa proses kematian sel secara apoptosis diperkirakan terjadi dalam waktu 4 sampai 24 jam, sehingga efek akut radiasi sinar gamma terhadap apoptosis sel epitel kolon hewan coba sudah dapat diamati (Pena, *et.al*, 2000).

Hewan coba yang dipilih sebagai sampel penelitian ini adalah *Rattus norvegicus* varian Wistar karena tikus ini merupakan hewan coba yang dapat digunakan untuk meneliti pengaruh radiasi sinar gamma sebab memiliki kemiripan struktur anatomi dengan manusia, mempunyai berat badan yang relatif ringan, serta pemeliharaannya mudah dan murah. Sesuai dengan hasil perhitungan rumus besar sampel, tikus yang diperlukan untuk setiap kelompok adalah 9 ekor. Karena ada 3 kelompok, yaitu kelompok kontrol, kelompok tunggal, dan kelompok fraksinasi, maka besar sampelnya adalah 27 ekor tikus.

6.1 Efek Radiasi Sinar Gamma terhadap Apoptosis Sel Epitel Kolon

Sesuai dengan hasil perhitungan rata-rata indeks apoptosis sel epitel kolon seperti yang tercantum pada tabel 5.1, dapat diketahui bahwa terdapat peningkatan indeks apoptosis sel epitel kolon pada kelompok yang diberi radiasi sinar gamma (kelompok tunggal dan fraksinasi) dibandingkan kelompok kontrol yang tidak diberi radiasi sinar gamma (kelompok kontrol). Melalui hasil penelitian ini pula dapat diketahui bahwa peningkatan indeks apoptosis sel epitel kolon pada kelompok yang diberi radiasi sinar gamma dosis fraksinasi 5x2 Gy (kelompok fraksinasi) lebih banyak daripada kelompok yang diberi radiasi sinar gamma dosis fraksinasi 1x10 Gy (kelompok tunggal).

Kemudian melalui analisis statistik dengan menggunakan uji *One-Way* ANOVA. Meskipun besar sampel banyak berkurang, dari 27 menjadi 15 dengan jumlah sampel yang berbeda pada setiap kelompok perlakuan, uji ANOVA tetap dapat dilakukan karena sesuai perhitungan, seluruh sampel lolos uji normalitas dan homogenitas dengan nilai $p > 0,05$. Berdasarkan hasil perhitungan analisis

statistik ANOVA, dapat diketahui bahwa ternyata peningkatan tersebut berbeda secara signifikan dengan nilai p sebesar 0,000 ($p < 0,05$).

Setelah mengetahui bahwa peningkatan rata-rata indeks apoptosis sel epitel kolon berbeda secara signifikan, dilakukan analisis *Tukey* dalam *Post Hoc Test* untuk mengetahui kelompok mana saja yang memiliki beda rata-rata secara nyata. Hasil analisis *Tukey* dalam *Post Hoc Test* menunjukkan bahwa baik kelompok kontrol dengan kelompok tunggal, kelompok kontrol dengan kelompok fraksinasi, maupun kelompok tunggal dengan kelompok fraksinasi, memiliki beda rata-rata yang signifikan dengan nilai p masing-masing sebesar 0,000 ($p < 0,05$).

Hasil beda rata-rata indeks apoptosis yang signifikan antara kelompok kontrol dengan kelompok tunggal, maupun kelompok kontrol dengan kelompok fraksinasi, menunjukkan bahwa radiasi sinar gamma terbukti dapat meningkatkan jumlah sel apoptosis pada sel epitel kolon. Hal ini sesuai dengan teori bahwa radiasi ionisasi, dalam hal ini sinar gamma, menginduksi terjadinya kematian sel secara apoptosis. Kerusakan untai ganda DNA akibat pemaparan radiasi sinar gamma tersebut mengaktifasi gen p53 yang merupakan agen pro-apoptotik. Aktivasi gen p53 selanjutnya mengaktifasi gen p21 yang merupakan protein cdk inhibitor sehingga secara langsung mensupresi aktivitas siklin-cdk dan menghentikan siklus sel pada fase G1 agar dapat dilakukan perbaikan DNA. Jika kerusakan DNA melebihi kapasitas sel untuk mengadakan perbaikan, maka akan mengaktifasi jalur apoptosis melalui serangkaian kaskade.

Hasil tersebut didukung oleh penelitian yang dilakukan oleh Hayashida, *et.al.* (2001). Penelitian tersebut bertujuan untuk mengidentifikasi berbagai abnormalitas jangka panjang pada tampilan makroskopis maupun mikroskopis kolon 77 tikus wistar betina setelah dilakukan radiasi sinar-X dosis tunggal total

36 Gy (0,875 Gy/menit). Pemberian radiasi dilakukan secara lokal di daerah lateral abdomen. Tikus diobservasi selama hingga minggu ke-60 setelah radiasi. Hasil penelitian tersebut mengungkapkan berbagai kelainan makroskopis dan mikroskopis pada kolon tikus yang diamati. Kelainan makroskopis meliputi pucut pada serosa, terabanya penebalan dinding, dan stenosis yang disertai dengan dilatasi proximal. Sedangkan perubahan histopatologis kolon yang diradiasi adalah ulkus mukosa, epitel atipik, penebalan serosa, sklerosis vaskuler, fibrosis dinding intestin, *ileitis cystica profunda*, dan kongesti saluran limfe.

Sementara itu, hasil beda rata-rata indeks apoptosis yang signifikan antara kelompok tunggal dengan kelompok fraksinasi, menunjukkan bahwa radiasi sinar gamma dosis fraksinasi terbukti dapat meningkatkan jumlah sel apoptosis pada sel epitel kolon daripada dosis tunggal. Hal ini bertentangan dengan hipotesis yang menyatakan bahwa radiasi sinar gamma menggunakan dosis fraksinasi menyebabkan apoptosis sel epitel kolon lebih banyak pada sel epitel kolon dibandingkan dengan dosis fraksinasi. Teori yang mendasari hipotesis tersebut adalah teori *Split-Dose Repair* (SDR). Radiasi fraksinasi dianggap mampu meningkatkan *survival rate* dengan adanya jeda waktu antara penyinaran 2 dosis radiasi (Lawrence *et al.*, 2008). Peningkatan *survival rate* tersebut melalui 4 prinsip radiobiologis yakni reoksigenasi, perbaikan (repair) kerusakan sel subletal, redistribusi sel pada siklus sel, dan repopulasi sel yang mampu bertahan (Balcer-Kubiczek, 2012).

Namun, hasil penelitian ini selaras dengan penelitian yang dilakukan oleh Bucci, *et.al* (2006) yang mengidentifikasi dampak pemberian radiasi ionisasi dosis tunggal (12,5 Gy) dan dosis fraksinasi (4 x 5 Gy) terhadap kultur sel astrocitoma manusia. Pengamatan dilakukan pada 24 jam, 48 jam, dan 72 jam

setelah pemberian radiasi ionisasi. Hasil penelitian tersebut mengungkapkan bahwa radiasi dosis fraksinasi menyebabkan jumlah sel apoptosis lebih banyak daripada dosis tunggal. Kematian sel secara apoptosis tersebut melalui aktivasi caspase-3 akibat pembentukan ROS (*reactive oxygen species*).

Lebih lanjut, penelitian tersebut juga menjelaskan bahwa radiasi ionisasi dosis fraksinasi menginduksi kematian sel secara apoptosis sedangkan radiasi dosis tunggal menginduksi kematian sel secara nekrosis (Bucci, *et.al*, 2006). Pemberian radiasi ionisasi dosis besar tunggal menyebabkan sel yang mengalami hipoksia lebih banyak daripada dosis kecil terbagi. Sel hipoksia ini kemudian mengalami kematian sel diinduksi iskemia (*ischemic cell death*) atau dapat disebut juga dengan nekrosis (IAEA, 2010).

Adanya perbedaan jalur kematian sel akibat radiasi ionisasi dipengaruhi oleh besarnya dosis pada setiap paparan. Paparan yang besar menyebabkan kematian sel secara nekrosis karena sel yang terpapar dosis besar mengalami cedera lebih berat daripada sel yang terpapar dosis kecil (IAEA, 2010). Hal tersebut didukung oleh hasil penelitian Rainaldi, *et.al.* (2003) yang mengidentifikasi jalur kematian sel yang diakibatkan oleh radiasi ionisasi dengan besar dosis yang berbeda, 5 Gy dan 30 Gy, pada kultur *MG-63 osteosarcoma multicellular spheroids*. Hasil penelitian tersebut mengungkapkan bahwa setelah paparan radiasi 5 Gy, MG-63 spheroids mengalami kematian melalui jalur apoptosis, sedangkan paparan 30 Gy menyebabkan kematian melalui nekrosis. Penelitian tersebut juga mengungkapkan bahwa protein bcl-2, bax, dan bcl-XL, terlibat pada aktivasi apoptosis pada MG-63 spheroid yang diradiasi sebesar 5 Gy. Namun mekanisme yang bertanggung jawab pada kematian yang diinduksi

radiasi belum dapat dijelaskan oleh penelitian tersebut sehingga diperlukan penelitian lebih lanjut.

Penelitian terbaru oleh Wang, *et.al.* (2013), yang meneliti efek biologis radiasi sinar-X dari iodin-125 sebesar 2, 4, 6, dan 8 Gy menggunakan dosis tunggal/SDR, fraksinasi/FDR, dan *continuous-low/CLDR* pada kultur sel kanker kolorektal CL-187, memberikan kesimpulan bahwa CLDR lebih efektif menginduksi apoptosis pada sel dan *G2/M cell cycle arrest*. Hasil penelitian tersebut juga mengungkapkan bahwa apoptosis lebih banyak terjadi pada kultur sel yang diradiasi dengan dosis fraksinasi daripada dosis tunggal, pada keseluruhan besar dosis yakni 2 Gy, 4 Gy, 6 Gy, dan 8 Gy. CLDR menyebabkan gangguan pada kemampuan untuk memperbaiki DNA melalui *down-regulation* ekspresi DNA-PK dan Ku70. DNA-PK atau *DNA-dependent Protein Kinase* merupakan protein yang memberi sinyal kepada p53 setelah mengenali adanya kerusakan DNA untuk kemudian mengaktifasi proses *DNA repair* (Watters, 1999).

Penjelasan lain yang mendukung hasil penelitian ini adalah hasil penelitian Denekamp dan Rojas (1989) yang menggunakan kultur sel mendapatkan adanya peningkatan radiosensitivitas sel setelah tiap fraksi radiasi dosis fraksinasi. Peningkatan ini disebabkan oleh mekanisme redistribusi sel ke fase lebih sensitif yaitu fase G2 dan fase M. Akibat paparan fraksi pertama radiasi, terjadi penurunan drastis jumlah sel pada fase G2. Namun, segera setelah paparan tersebut, sejumlah sel mengalami redistribusi ke fase G2 untuk mengisi kekosongan fase tersebut. Pada paparan fraksi berikutnya, sel-sel teredistribusi mengalami kematian akibat peningkatan radiosensitivitas dan begitu selanjutnya sehingga diperoleh sel mati dalam jumlah besar.

6.2 Keterbatasan Penelitian dan Faktor – Faktor yang Mempengaruhi Proses Penelitian

Saat proses penyinaran hewan coba menggunakan teleterapi Co₆₀, metode fiksasi hewan coba kurang memadai sehingga sinar yang diarahkan mengenai bagian dorsal tikus dan berpeluang menyebabkan akumulasi dosis di organ-organ bagian dorsal meskipun telah dilakukan penyesuaian *depth dose*

Selain itu, pada tahap perancangan penelitian, jumlah total sampel yang digunakan adalah sebanyak 27 sampel dengan masing-masing 9 sampel pada setiap kelompok perlakuan. Hal tersebut sesuai dengan hasil perhitungan rumus besar sampel. Namun pada akhir penelitian, jumlah total sampel tersisa 15 sampel dalam bentuk slide sediaan jaringan. Sampel tersebut banyak berkurang karena saat proses pengecatan immunohistokimia menggunakan antibodi caspase-3 aktif, banyak potongan jaringan kolon yang terlepas dari kaca objek.

Proses pembuatan slide sediaan jaringan dan pewarnaan immunohistokimia merupakan serangkaian proses berurutan yang keberhasilannya ditentukan oleh banyak variabel. Faktor-faktor yang mempengaruhi proses pewarnaan immunohistokimia antara lain penanganan jaringan (*tissue handling*), antibodi yang digunakan, dan protokol (Lackey, 2011) (Randolph-Habecker, 2013).

Penanganan jaringan (*tissue handling*) dianggap sebagai faktor terpenting dalam menghasilkan pewarnaan immunohistokimia berkualitas, karena menjadi tahap awal dari serangkaian proses. Fiksasi jaringan menggunakan *Neutral Buffer Formalin* (NBF) 10% sebanyak 20-30x volume jaringan merupakan cara umum yang direkomendasikan karena mampu menghasilkan detail morfologis yang baik. Jaringan yang diambil harus segera difiksasi dalam waktu <24 jam

pada suhu ruangan, karena makin lama penundaan dan makin tinggi suhu, akan meningkatkan autolisis jaringan sehingga merusak lokasi epitop. Ukuran spesimen yang difiksasi sebaiknya 3-5 mm untuk memudahkan penetrasi fiksator ke dalam jaringan. Data menunjukkan bahwa waktu optimal untuk fiksasi menggunakan formalin pada sebagian besar pewarnaan adalah 3-7 hari.

Mikrotomi juga menjadi faktor penting lainnya dalam pewarnaan jaringan. Jaringan sebaiknya dipotong dengan ketebalan 3-4 mikron. Ukuran ini memungkinkan adhesi jaringan pada kaca objek yang digunakan. Kaca objek yang digunakan adalah kaca objek yang bermuatan positif seperti *poly l-lysine slides*.

Pemilihan antibodi yang tepat menjadi elemen penting pada proses pewarnaan. Umumnya, antibodi dapat berupa antibodi monoklonal dari mencit dan antibodi poliklonal dari tikus. Antibodi poliklonal mampu berikatan dengan banyak epitop dan lebih sensitif, namun memiliki spesifisitas lebih rendah pada beberapa target sehingga dapat menimbulkan *false-positive*. Antibodi monoklonal hanya berikatan pada 1 atau sebagian kecil epitop yang berkaitan dengan antigen tertentu. Jika epitop rusak akibat kesalahan pada proses fiksasi, pemotongan, ataupun pewarnaan, maka dapat memunculkan *false-negative*.

Setelah jenis antibodi telah dipilih, penting untuk menentukan protokol yang tepat agar memperoleh hasil pewarnaan optimal. Protokol tersebut meliputi pemilihan *epitope retrieval*, *blocking reagents*, dilusi antibodi, durasi inkubasi dan suhunya, dan metode deteksi yang tepat. Masing-masing faktor tersebut dapat saling mempengaruhi. Protokol biasanya disertakan dalam paket antibodi oleh produsen.