

BAB VI

PEMBAHASAN

Apoptosis adalah suatu bentuk kematian sel yang terprogram dan merupakan salah satu indikator dampak adanya kerusakan DNA yang salah satu penyebabnya adalah akibat dari induksi dari radiasi ionisasi. *Cystein Aspartyl-specific Protease* atau yang biasa disebut sebagai caspase adalah suatu kelompok enzim protease yang merupakan regulator utama pada tiga fase dari apoptosis. Terdapat 14 jenis caspase yang teridentifikasi pada mamalia, dan salah satunya yaitu caspase-3, merupakan caspase yang berperan sebagai efektor/eksekusioner pada proses apoptosis. Pada saat fase eksekusi, yaitu pada saat dimana apoptosis mencapai tahap akhir dan sel mulai memperlihatkan karakteristik biokimiawi dan morfologi dari apoptosis, pada saat itulah caspase-3 menjadi aktif dan memiliki peran yang dominan dalam proses apoptosis. Maka dari itu, untuk penelitian ini, peneliti menggunakan caspase-3 sebagai parameter untuk identifikasi sel yang mengalami apoptosis karena caspase-3 adalah indikator yang paling *reliable* (Lee *et.al.*, 2003). Sel yang mengekspresikan caspase-3 akan dapat dikenali sebagai sel yang memperlihatkan warna cokelat pada sitoplasma, sesuai dengan lokalisasi dari 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) system replikasi yang sangat akurat oleh mekanisme *proofreading* dan (2) system perbaikan DNA yang mengalami

kerusakan. DNA merupakan satu-satunya molekul yang apabila rusak dapat diperbaiki oleh sel (Garett dan Grisham, 2005).

Kerusakan DNA mengaktifasi 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 *check points*. *Check points* 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, 2003).

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 gaster 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). Gaster hewan coba diambil melalui pembedahan pada 17-24 jam setelah pemberian radiasi sinar gamma, sesuai dengan teori yang menyatakan bahwa proses kematian sel secara apoptosis diperkirakan terjadi dalam waktu 4 sampai 24 jam (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 Gaster

Sesuai dengan hasil perhitungan rata-rata indeks apoptosis sel epitel gaster seperti yang tercantum pada tabel 5.1, didapatkan bahwa terdapat peningkatan indeks apoptosis sel epitel gaster pada kelompok yang diberi radiasi sinar gamma (dosis tunggal dan fraksinasi) dibandingkan dengan kelompok kontrol yang tidak diberi radiasi sinar gamma. Dari hasil penelitian itu pula ditemukan bahwa peningkatan indeks apoptosis sel epitel gaster yang diberi radiasi sinar gamma dosis tunggal 1×10 Gy (kelompok tunggal) lebih banyak daripada yang diberi radiasi sinar gamma dosis fraksinasi 5×2 Gy (kelompok fraksinasi).

Kemudian melalui analisis statistik dengan menggunakan uji *One-Way* ANOVA. Meskipun besar sampel berkurang banyak, dari 27 sampel menjadi 18 sampel dengan jumlah sampel yang berbeda pada setiap kelompok uji perlakuan, uji ANOVA tetap dapat dilakukan karena sesuai perhitungan, seluruh sampel lolos uji normalitas dengan $p = 0,200$, yang menunjukkan data terdistribusi secara normal karena $p > 0,05$, dan uji homogenitas dengan tes Levene menunjukkan hasil statistik yang signifikan, dengan $p = 0,372$, yang berarti

menunjukkan homogenitas dari varians tersebut sama, karena $p > 0,05$. Sedangkan berdasarkan hasil perhitungan analisis statistic *One-Way ANOVA*, didapatkan 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 gaster berbeda secara signifikan, dilakukan analisis *Tukey's Test* dalam *Post-Hoc Test* untuk mengetahui kelompok mana saja yang memiliki beda rata-rata secara nyata. Hasilnya, didapatkan bahwa kelompok kontrol dengan kelompok tunggal, dan kelompok kontrol dengan kelompok fraksinasi memiliki rata-rata yang signifikan dengan nilai p masing-masing 0,000 ($p < 0,05$). Sedangkan pada kelompok tunggal dengan kelompok fraksinasi didapatkan rata-rata dengan nilai $p = 0,001$ ($p < 0,05$).

Hasil beda rata-rata indeks apoptosis yang signifikan pada kelompok kontrol dengan kelompok tunggal, maupun pada kelompok kontrol dengan kelompok fraksinasi, menunjukkan bahwa sinar gamma terbukti dapat meningkatkan proses apoptosis pada sel epitel gaster. Hal ini sesuai dengan teori bahwa radiasi ionisasi, dalam hal ini sinar gamma, dapat menginduksi terjadinya kematian sel secara apoptosis. Kerusakan untai ganda DNA akibat pemaparan radiasi sinar gamma tersebut mampu mengaktivasi gen p53 yang merupakan agen pro-apoptotik. Aktivasi pada gen p53 ini kemudian mengaktivasi 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 mengaktivasi jalur apoptosis melalui serangkaian kaskade.

Sementara itu, hasil beda rata-rata indeks apoptosis yang signifikan antara kelompok tunggal dengan kelompok fraksinasi, menunjukkan bahwa pemberian radiasi sinar gamma dosis tunggal 1×10 Gy terbukti lebih meningkatkan kejadian apoptosis dari sel gaster dibandingkan dengan pemberian dosis fraksinasi 5×2 Gy. Hal ini mendukung hipotesis yang menyatakan bahwa radiasi sinar gamma dosis tunggal menyebabkan peningkatan kejadian apoptosis pada sel epitel gaster lebih tinggi dibandingkan dengan pemberian radiasi sinar gamma dosis fraksinasi. Teori yang mendasari hipotesis ini adalah teori *Split-Dose Repair* (SDR). Radiasi fraksinasi dianggap mampu meningkatkan *survival rate* dengan adanya jeda waktu 2 dosis radiasi (Lawrence *et al.*, 2008). Peningkatan *survival rate* tersebut melewati 4 prinsip radiobiologis, yaitu reoksigenasi, perbaikan kerusakan sel sublethal, redistribusi sel pada siklus sel, dan repopulasi sel yang mampu bertahan (Balcer-Kubiczek, 2012).

6.2 Keterbatasan Penelitian dan Faktor – Faktor yang Mempengaruhi Proses Penelitian

Saat proses penyinaran hewan coba menggunakan teleterapi Co_{60} , 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 saat akan dimulai pewarnaan imunohistokimia, organ gaster yang menempel pada slide banyak yang terlepas karena pada saat

proses pembuatan slide, parafin yang digunakan untuk menyimpan organ dalam keadaan kurang bagus. Akibatnya saat organ di fiksasi pada kaca slide kurang menempel dan mengakibatkan organ banyak yang terlepas saat melakukan proses pewarnaan immunohistokimia, jadi harus dilakukan parafin ulang agar organ pada kaca slide tidak mudah terlepas saat dilakukan pewarnaan. Hingga akhir penelitian, jumlah total sampel tersisa 15 sampel dalam bentuk slide sediaan jaringan.

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. Epitop adalah bagian dari antigen yang membuat antigen tersebut dapat dikenali oleh system imun tubuh, seperti antibodi, sel B, dan sel T. Antibodi monoklonal hanya berikatan pada 1 atau beberapa epitop yang berkaitan dengan antigen tersebut. 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.