

BAB I
PENDAHULUAN

1.1 Latar Belakang Masalah

Radioterapi adalah metode pengobatan penyakit keganasan dengan menggunakan radiasi yang bersumber dari energi radioaktif, dan bertujuan untuk menghambat proliferasi dan mematikan sel tumor (Baskar *et al.*, 2012; Bhide *et al.*, 2012). Data *World Health Organization* (WHO) menunjukkan, lebih dari 550.000 kasus baru kanker kepala dan leher yang ditemukan setiap tahun dengan angka kematian mencapai 300.000 (WHO, 2014). Data registrasi di Indonesia, pada 2012 prevalensi kanker kepala dan leher mencapai 9,14% atau sekitar 32.000 penduduk, sedangkan kanker payudara sebanyak 16%, dan kanker serviks 10,8% (Pratama, 2016).

Radioterapi kanker kepala dan leher menerima total dosis 50-70 gray (Gy) yang diberikan dalam dosis pecahan (fraksinasi) yaitu 1,8-2 Gy per hari (Malick *et al.*, 2016), 5 hari dalam seminggu dan diberikan selama 5-7 minggu (Sonstevold *et al.*, 2015). Penurunan *massive* produksi saliva terutama pada minggu pertama pemberian radiasi yang menyebabkan penurunan produksi saliva mencapai 50-60% dengan dosis total 10 Gy (*moderate dose*), fungsi normal sel dan jaringan masih dapat diamati setelah pemajanan dengan radiasi ionisasi (Coleman, 2003). Dosis fraksinasi adalah dosis yang diberikan pada terapi klinis, yang memberi kesempatan perbaikan pada jaringan normal disekitar daerah radiasi terhadap kerusakan, karena

jaringan normal mempunyai ketahanan yang lebih tinggi terhadap radiasi dibandingkan dengan sel-sel kanker (Baskar *et al.*, 2012).

Radioterapi diketahui mampu memperpanjang masa hidup pasien dan memperbaiki kualitas hidup, namun radioterapi tidak hanya mematikan sel tumor tetapi juga memiliki risiko yang tidak diinginkan terhadap jaringan normal di sekitarnya sehingga dapat menimbulkan efek samping yang tidak diharapkan (Santivasi *and* Xia, 2014 ; Marmary *et al.*, 2016). Efek samping radioterapi kepala dan leher yang paling sering terjadi yaitu berupa gangguan fungsi sekresi saliva atau xerostomia (Xiang *et al.*, 2012; Wu *and* Leung, 2019). Saliva adalah komponen *host defense* yang penting dari rongga mulut. Kelenjar saliva mayor yaitu kelenjar parotis, kelenjar submandibularis, dan kelenjar sublingualis mempunyai kontribusi sekresi saliva dan konten elektrolit dengan volume paling besar yaitu 90% (Pinna *et al.*, 2015). Cairan saliva kelenjar submandibularis bersifat mukus (kental) dan lebih radioresisten dibandingkan kelenjar mayor yang lain (Avila *et al.*, 2009).

Xerostomia dapat dialami oleh 80% pasien yang menjalani radioterapi kepala dan leher (Pinna *et al.*, 2015). Aliran saliva menurun 50-70% setelah pemberian radiasi 10-16 Gy dan tidak terdeteksi setelah 40-42 Gy (Bhide *et al.*, 2012) Xerostomia menimbulkan perubahan volume, konsistensi, dan pH saliva sehingga menimbulkan berbagai keluhan pada rongga mulut antara lain mulut kering, nyeri dan kesulitan saat mengunyah maupun menelan, perubahan kualitas suara, hilangnya cita rasa, saliva menjadi lebih pekat dan asam (Pinna *et al.*, 2015). Kondisi tersebut mengakibatkan penurunan kesehatan rongga mulut, meningkatkan

risiko karies gigi, erosi enamel, mukositis, dan periodontitis karena berkurangnya air liur yang memiliki sifat antimikroba. Ketidakstabilan gigi palsu terjadi karena berkurangnya sekresi saliva yang dapat membantu retensi, stabilitas dan kenyamanan gigi palsu. Tidur terganggu karena kekeringan mulut yang menyebabkan pasien sering terbangun dengan lidah melekat pada *palatum durum* juga kebutuhan untuk sering mengeluarkan saliva yang kental (Pinna *et al.*, 2015). Xerostomia dapat menyebabkan perubahan rasa, mengurangi nafsu makan sehingga menyebabkan penurunan berat badan, kekurangan gizi yang pada akhirnya dapat mengganggu kesehatan penderita secara umum (Tolentino *et al.*, 2011; Pinna *et al.*, 2015).

Efek samping radioterapi di daerah kepala dan leher masih sulit dicegah walaupun telah digunakan teknologi maju berupa IMRT (*Intensity Modulated Radiotherapy*) dengan teknologi tiga dimensi yang memungkinkan sumber sinar diarahkan langsung pada sel target (Morgan-Bathke *et al.*, 2014). Penelitian pada hewan coba telah dilakukan, antara lain yang dilakukan oleh Xiang dengan menggunakan *Phenylephrine*. Namun penggunaan bahan-bahan kimia memiliki manifestasi klinis yang tidak diinginkan, termasuk mual, muntah, hipotensi, reaksi alergi, trombositopenia, leukopenia, konstipasi, hilangnya nafsu makan, penglihatan kabur dan lain-lain (Saiki *et al.*, 2018; Xiang *et al.*, 2013).

Sinar-X yang digunakan pada radioterapi merupakan gelombang elektromagnetik yang mempunyai energi relatif besar dan daya tembus yang tinggi, mampu mengionisasi dengan mentransfer sejumlah energi pada atom dan biomolekul target sehingga berubah karakteristiknya. Transfer energi ini

memberikan konsekuensi penting berupa meningkatnya *reactive oxygen species* (ROS) yang terjadi terutama melalui dekomposisi air seluler (Azzam *et al.*, 2012; Holley *et al.*, 2014). ROS mempunyai kecenderungan menarik elektron sehingga mengubah suatu molekul menjadi suatu radikal, sehingga dikatakan memiliki sifat reaktivitas tinggi. Molekul yang elektronnya ditarik oleh ROS akan mengalami kerusakan sel, gangguan fungsi sel, sampai pada kematian sel. Molekul utama yang dirusak adalah *deoxyribo nucleic acid* (DNA), membran lipid, dan protein (Duvvuri *and* Kubicek, 2014). Asam lemak tak jenuh (PUFA) yang terdapat pada membran sel merupakan komponen penting fosfolipid penyusun membran sel. *Polyunsaturated Fatty Acids* (PUFA) dapat teroksidasi oleh ROS yang disebut sebagai peroksidasi lipid. Hal ini mempengaruhi perubahan pada permeabilitas membran sel yang mengakibatkan kematian sel. Peroksidasi lipid merupakan komponen penting dari stres oksidatif (Bertolin, 2011). Penilaian kondisi stres oksidatif pada sistem biologi secara umum dilakukan dengan mengukur penanda kerusakan oksidatif (terhadap lipid, protein, dan DNA) dan status oksidan. Mendeteksi kondisi stres oksidatif hasil dari peroksidase lipid membran sel di dalam tubuh akibat ROS, salah satu indikatornya adalah kadar F2-isoprostan (Halliwell *and* Lee, 2010). Isoprostan adalah rangkaian senyawa prostaglandin yang dihasilkan oleh reaksi ROS dengan asam arakidonat yang saat ini dikenal luas sebagai *biomarker* yang dapat diandalkan dari stres oksidatif (Janicka *et al.*, 2010). Kerusakan oksidatif ini menyebabkan kerusakan protein yang menimbulkan terganggunya fungsi reseptor, enzim, antibodi, transport protein, dan kerusakan DNA (Bertolin *et al.*, 2011).

Berbagai senyawa perusak DNA seperti radiasi pengion direspons oleh p53 yang merupakan *tumor suppressor gen*. Protein 53 mengalami *up-regulation* dan aktivitasnya meningkat dengan mengaktifkan sejumlah gen *down stream* sasaran yang sebagian besar menjadi mediasi apoptosis *p53 dependent* atau *arrest* pertumbuhan sel (Lee *et al.*, 2013). Fosforilasi dan asetilasi terjadi karena adanya aktivasi p53 sehingga terjadi peningkatan kadar p53. Peningkatan kadar p53 akan mengaktifasi *cell cycle inhibitor* yaitu p21 untuk memblokir siklus sel pada fase G1. Protein 53 mengaktifasi GADD45 agar DNA dapat diperbaiki. Bila berhasil maka sel akan kembali normal, tetapi apabila gagal p53 akan meningkatkan Bax yang merupakan gen pro-apoptosis dan menekan Bcl-2. Bcl-2 adalah pengatur apoptosis. Famili Bcl-2 dapat menginduksi (*pro-apoptotic agent*) atau menghambat (*anti-apoptotic agent*). Kondisi ini menyebabkan *pt-pore* membran terbuka sehingga mengakibatkan sitokrom C keluar dan kemudian berikatan dengan APAF-1. Kondisi tersebut menyebabkan *caspase-cascade* aktif. Protein caspase dapat bekerja sebagai caspase inisiator atau caspase eksekutor, pada penelitian ini *marker* yang digunakan adalah caspase-3 karena merupakan caspase eksekutor yang paling penting (Gudkov *et al.*, 2010; Lee *et al.*, 2013).

Kerusakan protein akibat ROS yang terjadi pada membran sel asinar menyebabkan terjadinya perubahan ekspresi protein AQP5. Perubahan ekspresi AQP5 ini mengakibatkan aktivitas AQP5 sebagai saluran air menurun, dan fungsinya dalam menyalurkan cairan juga akan menurun (Matsuzaki *et al.*, 2012). Mengatasi ketidakseimbangan ROS adalah dengan menggunakan agen antioksidan eksogen, yang bekerja dengan mencegah atau menghambat pembentukan ROS

(Halliwell *and* Gutteridge, 2015). Antioksidan alami semakin banyak digunakan baik untuk preventif maupun pengobatan suatu penyakit, karena lebih aman bagi kesehatan manusia (Jiang *et al.*, 2017). Penggunaan bahan alami dari mikroalga mengandung senyawa bioaktif sebagai antioksidan alami. *Spirulina platensis* adalah mikroalga yang dapat dimanfaatkan sebagai suplemen maupun bahan pengobatan alami. Indonesia merupakan negara maritim kepulauan terbesar di dunia. Kekayaan serta keanekaragaman biota dan ekosistem laut menjadikan laut nusantara sebagai penghasil keanekaragaman hayati bahari. Indonesia mempunyai sumber daya kelautan yang melimpah tetapi pemanfaatannya belum benar-benar optimal. Penelitian ini memanfaatkan *Spirulina platensis* sebagai salah satu biota laut yang mengandung vitamin seperti vitamin *Spirulina platensis* adalah alga biru hijau yang kaya akan senyawa bioaktif dan telah banyak digunakan sebagai suplemen maupun bahan pengobatan alami (Pak, 2012). *Spirulina platensis* memiliki kandungan protein yang tinggi (60-70%), *phytopigments* (beta karoten, klorofil dan fikosianin), vitamin, mineral, asam lemak esensial, asam amino esensial, dan kandungan nutrisi lainnya (Wu *et al.*, 2016). Berbagai penelitian yang telah dilakukan, *Spirulina platensis* mempunyai kemampuan seperti antioksidan, antiinflamasi, imunomodulator (Wu *et al.*, 2016) antidiabetes, neuroprotektif, antikanker, hepatoprotektif (Al-Dhabi and Arasu, 2016).

Penelitian terbaru menunjukkan bahwa *Spirulina platensis* membantu untuk mengikat unsur radioaktif dan berguna untuk melindungi tubuh manusia dari paparan terapi radiasi (*radioprotective effect*). Senyawa fenolik yang ada dalam *Spirulina platensis* yang terutama terlibat dalam mekanisme redoks dan bertindak

sebagai donor hidrogen, dan *metal chelator singlets*, dan meningkatkan kadar oksigen. Oleh karena itu, senyawa fenolik dapat mencegah pembentukan ROS, yang meliputi radikal bebas, seperti anion superoksida, radikal hidroksil dan spesies non radikal contohnya, seperti hidrogen peroksida dan hipoklorida. Pengembangan senyawa fenolik sebagai antioksidan untuk pengobatan berbagai penyakit manusia telah meningkat (Al-Dhabi *and* Arasu, 2016). Fikosianin merupakan salah satu kandungan yang terdapat pada *Spirulina platensis* yang memiliki kemampuan sebagai antioksidan yang mampu menghambat peroksidasi lipid pada tikus (Bertolin *et al.*, 2011). *Spirulina platensis* diharapkan dapat menjadi salah satu alternatif upaya pencegahan (preventif) terjadinya xerostomia akibat radioterapi kepala dan leher, dan informasi penelitian ini belum pernah ditemukan sebelumnya.

Studi eksperimental laboratoris ini dilakukan sebagai upaya mengatasi permasalahan dengan cara melakukan pencegahan penurunan sekresi saliva yang diakibatkan oleh radioterapi sinar-X dengan pemberian *Spirulina platensis* agar keparahan dapat berkurang. Penelitian ini menggunakan dosis fraksinasi 10 Gy yang merupakan dosis sedang (*moderate dose*) dan dosis aplikasi di dalam bidang kesehatan dimana kelenjar saliva mengalami kehilangan fungsi namun sel dan jaringan masih dapat diamati setelah iradiasi (Bucci *et al.*, 2006; Grundmann *et al.*, 2009). Pemeriksaan dilakukan pada fase kerusakan akut (*acute damage*) yaitu 24 jam setelah iradiasi fraksinasi terakhir. Fase akut sudah menunjukkan perubahan komposisi dan volume saliva (Grundmann *et al.*, 2009). *Spirulina* diberikan intra oral 7 hari sebelum dan 5 hari selama iradiasi.

1.2 Rumusan Masalah

1. Apakah pemberian alga biru hijau (*Spirulina platensis*) dapat menurunkan kadar F2-isoprostan tikus Wistar akibat radiasi sinar-X dosis fraksinasi 10 Gy pada waktu pengamatan 24 jam setelah iradiasi berakhir?
2. Apakah pemberian alga biru hijau (*Spirulina platensis*) dapat menurunkan ekspresi p53 pada sel asinar kelenjar submandibularis tikus Wistar akibat radiasi sinar-X dengan dosis fraksinasi 10 Gy pada waktu pengamatan 24 jam setelah iradiasi berakhir?
3. Apakah pemberian alga biru hijau (*Spirulina platensis*) dapat meningkatkan ekspresi Bcl-2 pada sel asinar kelenjar submandibularis tikus Wistar akibat radiasi sinar-X dengan dosis 10 Gy pada waktu pengamatan 24 jam setelah iradiasi berakhir?
4. Apakah pemberian alga biru hijau (*Spirulina platensis*) dapat menurunkan ekspresi caspase-3 sel asinar kelenjar submandibularis tikus Wistar akibat radiasi sinar-X dengan dosis fraksinasi 10 Gy pada waktu pengamatan 24 jam setelah iradiasi berakhir?
5. Apakah pemberian alga biru hijau (*Spirulina platensis*) meningkatkan ekspresi protein AQP5 sel asinar kelenjar submandibularis tikus Wistar akibat radiasi sinar-X dengan dosis fraksinasi 10 Gy pada waktu pengamatan 24 jam setelah iradiasi berakhir?

6. Apakah pemberian alga biru hijau (*Spirulina platensis*) meningkatkan sekresi saliva tikus Wistar akibat radiasi sinar-X dengan dosis fraksinasi 10 Gy pada waktu pengamatan 24 jam setelah iradiasi berakhir?
7. Apakah terdapat korelasi kadar F2 isoprostan, ekspresi p53, ekspresi Bcl-2, ekspresi caspase-3, ekspresi AQP-5, dan sekresi saliva pada mekanisme proteksi serbuk alga biru hijau (*Spirulina platensis*) terhadap terjadinya xerostomia akibat radiasi sinar-X?

1.3 Tujuan Penelitian

1.3.1 Tujuan Umum

Menjelaskan mekanisme proteksi xerostomia dengan pemberian serbuk alga biru hijau (*Spirulina platensis*) akibat radiasi sinar-X.

1.3.2 Tujuan Khusus

1. Membuktikan penurunan kadar F2-isoprostan dengan pemberian serbuk alga biru hijau (*Spirulina platensis*) pada tikus Wistar akibat radiasi sinar-X dengan dosis fraksinasi 10 Gy pada waktu pengamatan 24 jam setelah iradiasi berakhir.
2. Membuktikan penurunan ekspresi p53 dengan pemberian serbuk alga biru hijau (*Spirulina platensis*) pada sel asinar kelenjar submandibularis tikus Wistar akibat radiasi sinar-X dengan dosis fraksinasi 10 Gy pada waktu pengamatan 24 jam setelah iradiasi berakhir.
3. Membuktikan peningkatan ekspresi Bcl-2 dengan pemberian serbuk alga biru hijau (*Spirulina platensis*) pada sel asinar kelenjar submandibularis tikus

Wistar akibat radiasi sinar-X dengan dosis fraksinasi 10 Gy pada waktu pengamatan 24 jam setelah iradiasi berakhir.

4. Membuktikan penurunan ekspresi caspase-3 dengan pemberian serbuk alga biru hijau (*Spirulina platensis*) pada sel asinar kelenjar submandibularis tikus Wistar akibat radiasi sinar-X dengan dosis fraksinasi 10 Gy pada waktu pengamatan 24 jam setelah iradiasi berakhir.
5. Membuktikan peningkatan ekspresi protein AQP5 sel asinar kelenjar submandibularis tikus Wistar dengan pemberian serbuk alga biru hijau (*Spirulina platensis*) yang diberi radiasi sinar-X dengan dosis fraksinasi 10 Gy pada waktu pengamatan 24 jam setelah iradiasi berakhir.
6. Membuktikan peningkatan sekresi saliva tikus Wistar dengan pemberian serbuk alga biru hijau (*Spirulina platensis*) yang diberi radiasi sinar-X dengan dosis fraksinasi 10 Gy pada waktu pengamatan 24 jam setelah iradiasi berakhir.
7. Membuktikan adanya korelasi kadar F2-isoprostan, ekspresi p53, ekspresi Bcl-2, ekspresi caspase-3, ekspresi AQP5, dan sekresi saliva pada mekanisme proteksi serbuk alga biru hijau (*Spirulina platensis*) terhadap terjadinya xerostomia akibat radiasi sinar-X.

1.4 Manfaat Penelitian

1.4.1 Manfaat Teoritis

1. Hasil penelitian ini diharapkan dapat memberi informasi ilmiah mengenai mekanisme proteksi serbuk alga biru hijau (*Spirulina platensis*) terhadap hambatan terjadinya xerostomia akibat radiasi sinar-X.
2. Hasil penelitian ini diharapkan dapat digunakan sebagai dasar teori untuk pengembangan penelitian patologi molekuler lebih lanjut.

1.4.2 Manfaat Praktis

1. Hasil penelitian ini diharapkan dapat dijadikan sebagai dasar pemikiran dalam melakukan tindakan pencegahan terjadinya xerostomia terutama sebagai akibat dari terapi radiasi sinar-X.
2. Hasil penelitian ini diharapkan dapat meningkatkan potensi sumber daya laut, khususnya biota alam alga biru hijau (*Spirulina platensis*) dalam bidang kesehatan.