

· APOPTOSIS
- IONIZING RADIATION

TESIS

EFEK RADIASI IONISASI DOSIS TUNGGAL TERHADAP APOPTOSIS SEL FIBROBLAS JARINGAN PULPA

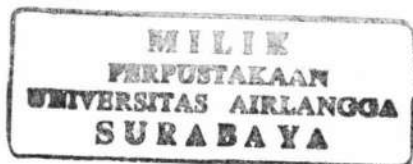
Penelitian eksperimental laboratorium pada tikus putih (*Ratus norvegicus*)

TK6 02/05
Sup
e



Oleh :

SUPRIYADI
NIM 090214784 / M



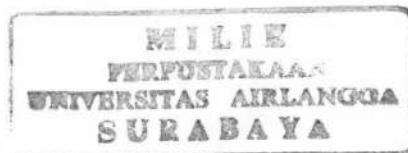
PROGRAM PASCASARJANA
UNIVERSITAS AIRLANGGA
SURABAYA
2004

EFEK RADIASI IONISASI DOSIS TUNGGAL TERHADAP APOPTOSIS SEL FIBROBLAS JARINGAN PULPA

Penelitian eksperimental laboratorium pada tikus putih (*Ratus norvegicus*)

TESIS

**Untuk Memperoleh Gelar Magister
dalam Program Studi Ilmu Kesehatan Gigi
pada Program Pascasarjana Universitas Airlangga**



Oleh :

**SUPRIYADI
NIM 090214784 / M**

**PROGRAM PASCASARJANA
UNIVERSITAS AIRLANGGA
SURABAYA
2004**

Lembar Pengesahan

TESIS INI TELAH DISETUJUI

TANGGAL 15 Desember 2004

Oleh

Pembimbing Ketua



Prof. Dr. Mandojo Rukmo, drg, MSc, SpKG
NIP 130 675 839

Pembimbing



Prof. Dr. Hadi Soenartyo, drg, MSc, SpPM
NIP 130 345 902

Mengetahui

Ketua Program Studi Ilmu Kesehatan Gigi



Dr. Trijoedani Widodo, drg, MS, SpKG
NIP 130 368 691

Telah diuji pada

Tanggal 15 Desember 2004

PANITIA PENGUJI TESIS

Ketua : Prof. Dr. Suhartono Taat Putra, dr, MS

Anggota : 1. Prof. Dr. Mandojo Rukmo, drg, MSc, SpKG

2. Prof. Dr. Hadi Soenartyo, drg, MSc, SpPM

3. Dr. H. Latief Mooduto, drg, MS, SpKG

4. Hanindyo Soelarso, drg, M.S.



UCAPAN TERIMA KASIH

Segala puji dan syukur alhamdulillah saya panjatkan kepada Allah SWT yang telah memberikan rahmat dan karunia-Nya sehingga saya dapat menyelesaikan tesis dan pendidikan program magister ini dengan baik. Pada kesempatan ini saya ingin mengucapkan terima kasih yang sebesar-besarnya kepada pihak-pihak yang telah membantu baik langsung maupun tidak langsung kepada saya, antara lain:

Pemerintah Republik Indonesia dalam hal ini Menteri Pendidikan Nasional, yang telah memberikan dana pendidikan melalui BPPS untuk mengikuti dan menyelesaikan pendidikan program Magister Ilmu Kesehatan Gigi di Program Pascasarjana Universitas Airlangga Surabaya.

Rektor Universitas Airlangga, Prof. Dr. Med. Puruhito, dr, Sp.B, atas ijin dan kesempatan yang diberikan kepada saya untuk mengikuti Program Magister pada Program Pascasarjana Universitas Airlangga Surabaya.

Direktur Program Pascasarjana Universitas Airlangga Surabaya: Prof. Dr. H. Muhammad Amin, dr, SpP, atas kesempatan yang diberikan kepada saya untuk mengikuti Program Magister pada Program Pascasarjana Universitas Airlangga Surabaya.

Ketua Program Studi Ilmu Kesehatan Gigi Program Pascasarjana Universitas Airlangga Surabaya: Dr. Trijoedani Widodo, drg, M.S. Sp.KG; atas pengarahan dan petunjuk yang diberikan sehingga saya dapat menyelesaikan pendidikan Program Magister.

Rektor Universitas Jember Prof. Dr. T. Soetikto, Ir, MSc dan mantan Rektor Universitas Jember Prof. Dr. H. Kabul Santoso, MS; atas ijin yang diberikan kepada saya untuk mengikuti Program Magister pada Program Pascasarjana Universitas Airlangga Surabaya.

Dekan Fakultas Kedokteran Gigi Universitas Jember : Zahreni Hamzah, drg, MS dan mantan Dekan Fakultas Kedokteran Gigi Universitas Jember: H. Bob Soebijantoro, drg, MSc, SpProst.; atas ijin yang diberikan kepada saya untuk mengikuti Program Magister pada Program Pascasarjana Universitas Airlangga Surabaya.

Kepala Bagian Ilmu Kedokteran Gigi Dasar Fakultas Kedokteran Gigi Universitas Jember : H. Sony Soebijantoro, drg, M.Kes.; juga Kepala Bagian Ilmu Konservasi Gigi Fakultas Kedokteran Gigi Universitas Jember: Sri Lestari, drg, M.Kes., dan mantan Kepala Bagian Ilmu Konservasi Gigi Fakultas Kedokteran Gigi Universitas Jember : Ekiyantini Widowati, drg.; atas ijin yang diberikan

kepada saya untuk mengikuti Program Magister pada Program Pascasarjana Universitas Airlangga Surabaya.

Prof. Dr. Mandojo Rukmo, drg, MSc, SpKG selaku pembimbing akademik dan pembimbing ketua pada penelitian tesis saya, yang telah memberi bimbingan kepada saya dengan penuh kesabaran dan motivasi dalam memberikan arahan sehingga saya dapat menyelesaikan pendidikan magister dan tesis ini dengan baik.

Prof. Dr. Hadi Soenartyo, drg, MSc, SpPM., selaku pembimbing kedua dalam penyusunan tesis ini, yang juga dengan sabar dan selalu terbuka dalam memberikan bimbingan kepada saya.

Prof. Dr. Suhartono Taat Putra, dr, MS, yang selalu bersedia memberikan kesempatan dan waktunya kepada saya untuk berdiskusi dan berkonsultasi.

Dr. Ketut Suidiana, Drs, MS., yang telah bersedia meluangkan waktu untuk berdiskusi dan telah banyak membantu saya selama melakukan penelitian di GRAMIK Fakultas Kedokteran Universitas Airlangga Surabaya.

Drh. Choirul Anwar, MS; yang telah banyak membantu saya dalam pembuatan foto mikroskop.

Para dosen penguji yaitu Prof.Dr.Suhartono Taat Putra, dr, MS sebagai ketua dosen penguji; anggota dosen penguji yaitu Prof. Dr. Mandojo Rukmo, drg, MSc, SpKG., Prof. Dr. Hadi Soenartyo, drg, MSc, SpPM., Dr. Latief Mooduto, drg, MS, SpKG., drg. Hanindy Soelarso, MS; yang telah banyak memberikan masukan dalam ujian proposal dan ujian akhir tesis ini.

Direktur RSU Dr. Sutomo Surabaya, Kepala Instalasi Radioterapi RSU Dr. Sutomo Surabaya yang telah memberikan izin kepada saya mendapatkan fasilitas radiasi untuk penelitian saya. Saya sampaikan terima kasih juga yang sebesar-besarnya kepada Bpk. Hariadi, Mas Adi, Mbak Anis dan semua staf di Instalasi Radioterapi yang telah banyak membantu saya dalam perizinan dan melakukan radiasi.

Rekan peserta didik di Program Studi Ilmu Kesehatan Gigi angkatan 2002, yaitu: Diah Styorini, drg, M.Kes, Budi Yuwono, drg, M.Kes., Galih Sampurna, drg, M.Kes., Christian Kuswanto, drg, M.Kes., Hendrik Setia Budi, drg, M.Kes, Mbak Elly, drg, M.Kes. atas kerjasama yang baik selama dalam pendidikan.

Bpk. Supardi yang telah membantu saya mendapatkan hewan coba dan sekaligus membantu saya dalam melakukan radiasi; Mak Leni di GRAMIK yang telah banyak membantu saya dalam pengecatan; Bpk.Suyitno di Lab.Anatomi-Histologi yang telah membantu saya dalam pembuatan sediaan selama studi pendahuluan.; serta Bpk Sawukir di Lab.Anatomi-Histologi yang telah membantu saya selama pengamatan dan penghitungan sel.

Istri saya tercinta, Susi Wahyuning Asih, SKep, Ners., yang dengan sabar mendampingi dan mendengar keluh kesah saya, yang selalu memberikan dorongan semangat ketika saya menghadapi kesulitan.

Kedua Anak saya tercinta : Fikri Auliya Al-Hamdhi dan Imanda Tsania Putri Al-Hamdhi. Kalian berdua adalah sumber motivasi dan semangat bagi ayah selama menempuh pendidikan magister ini. Semoga kelak kalian berdua diberikan kesempatan oleh Allah SWT untuk mendapatkan pendidikan dan pekerjaan yang lebih baik dari ayah dan dapat menjadi manusia kaamil yang berguna bagi agama, bangsa dan negara.

Orang tua saya, Bpk. Samirin(alm) dan Ny Sarti, yang selalu memberikan do'a dan restunya, semoga apa yang saya dapatkan sampai sekarang ini dicatat oleh Allah SWT sebagai bagian dari amal ibadah yang berpahala terus menerus untuk bapak dan Ibu sebagai balasan jasa bapak ibu dalam mendidik saya dulu.

Mertua saya : Bpk. Soekarto (alm) dan Ny. Rijami,AMPd., yang banyak memberikan dorongan semangat, memberikan tempat tinggal dan membantu mengasuh kedua anak saya selama pendidikan saya. Terima kasih juga buat saudara-saudara saya: Siti Juwariyah dan Bpk.Wakimin; Siti Chonifah dan Mas Ali Imron serta Siti Nafi'ah dan M.Nur serta Oni, ST, yang selalu meberikan dorongan dan do'a-nya.

Kepada semua pihak yang tidak mungkin saya sebutkan satu persatu disini, yang telah memberikan bantuan baik langsung maupun tidak langsung dalam penelitian dan penyusunan tesis ini.

Akhirnya dengan segala kelebihan dan kekurangan yang ada dalam tesis ini, saya berharap semoga tesis ini berguna bagi yang membaca dan bagi pengembangan ilmu khususnya Ilmu Radiologi Kedokteran Gigi dan Patobiologi jaringan pulpa.

Surabaya, Desember 2004

Penulis

RINGKASAN**EFEK RADIASI IONISASI DOSIS TUNGGAL TERHADAP
APOPTOSIS SEL FIBROBLAS JARINGAN PULPA****Penelitian eksperimental laboratorium pada tikus putih (*Ratus norvegicus*)****Supriyadi**

Radiasi ionisasi telah umum digunakan dalam pengobatan berbagai kanker termasuk pada kanker di daerah kepala dan leher. Penggunaan radiasi ionisasi dapat menimbulkan efek biologis berupa kematian sel, yaitu nekrosis dan apoptosis dalam jangka pendek serta keganasan dalam jangka panjang. Efek samping radioterapi kanker kepala-leher yang sudah umum terjadi adalah peningkatan insidensi karies gigi dan kecepatan perkembangan karies dan kerusakan gigi yang lain. Diduga radiasi juga menyebabkan kematian sel dalam jaringan pulpa terutama sel fibroblas yang berjumlah paling banyak dalam jaringan pulpa. Apoptosis sel fibroblas jaringan pulpa secara *in vivo* akibat radiasi ionisasi sampai saat ini belum pernah dibuktikan. Penelitian ini bertujuan untuk membuktikan peningkatan apoptosis sel fibroblas jaringan pulpa akibat radiasi ionisasi dosis tunggal secara *in vivo*.

Penelitian ini adalah penelitian eksperimental laboratorium dengan menggunakan rancangan penelitian *Post-test Control Group Design*. Sampel penelitian adalah tikus jantan *strain wistar*, umur 3-4 bulan, sehat dan berat badan antara 150 – 200 gram. Sampel penelitian sebanyak 24 ekor tikus yang dibagi dalam 4 kelompok, yaitu: kelompok 1 sebagai kontrol (tanpa paparan radiasi/ radiasi 0 rad), kelompok 2 (mendapat paparan radiasi dosis tunggal 100 rad), kelompok 3 (mendapat paparan radiasi dosis tunggal 200 rad) dan kelompok 4 (mendapat paparan radiasi dosis tunggal 400 rad). Sumber radiasi adalah *Cobalt 60* yang dipaparkan pada daerah kepala binatang coba yang difiksasi dengan posisi telentang tanpa anestesi. Semua sampel dikorbankan 24 jam setelah paparan radiasi, kemudian gigi insisivus bawah diambil dan diproses untuk pembuatan sediaan histopatologi. Deteksi apoptosis menggunakan metode *TUNEL Assay* dan pengecatan sediaan dilakukan secara histokimia menggunakan *S7101 Apoptag*

Plus Peroxidase In Situ Apoptosis Detection Kit. Pengamatan dan penghitungan sel apoptosis dilakukan dibawah mikroskop pembesaran 400 kali oleh tiga orang pengamat yang kompeten dengan teknik *blind test*. Pengamatan dilakukan pada sel fibroblas yang terdapat dibawah lapisan odontoblas dan lapisan bebas sel. Penghitungan dilakukan secara persentase pada dua tempat, yaitu bagian labial dan palatal; kemudian diambil reratanya. Data hasil penelitian dianalisis menggunakan *One-way Anova* dan uji *Least Significant Difference (LSD)* dengan tingkat kesalahan (α) 0,05.

Hasil penelitian menunjukkan bahwa terjadi peningkatan persentase apoptosis sel fibroblas jaringan pulpa sesuai peningkatan dosis radiasi dari 0, 100 dan 200 rad, tetapi terjadi penurunan kembali pada dosis radiasi 400 rad. Analisis statistik *One-way Anova* menunjukkan bahwa terdapat perbedaan yang bermakna ($p < 0,05$) persentase apoptosis sel fibroblas jaringan pulpa akibat radiasi ionisasi diantara kelompok 1 (kontrol), kelompok 2, kelompok 3 dan kelompok 4.

Kesimpulan penelitian ini adalah terjadi peningkatan persentase apoptosis sel fibroblas jaringan pulpa sesuai peningkatan dosis radiasi dari 0, 100 dan 200 rad, tetapi terjadi penurunan kembali pada dosis radiasi 400 rad. Penurunan persentase apoptosis pada dosis 400 rad diduga disebabkan peningkatan jenis kematian sel yang lain, yaitu nekrosis.

SUMMARY

SINGLE DOSAGE IONIZING RADIATION EFFECT ON APOPTOTIC OF FIBROBLAST PULP CELL

(Laboratory experimental research on *ratus norvegicus wistar strain*)

Supriyadi

Ionizing radiation is commonly used in the treatment of various cancer including cancer in the area of head and neck. The use of ionizing radiation can generate biologic effects in the form of cell death that is apoptotic or necrosis in short term, and also malignancy on a long term. The common side effect of radiotherapy on head and neck cancer was increased of caries incidence and a development of caries and another tooth decay. Ionizing radiation also supposed to cause cell death of pulp cell especially fibroblast that it's most numerous in the pulp. In vivo apoptotic of fibroblast pulp cell caused by ionizing radiation up to now have never established. The purpose of this study was to prove the apoptotic increasing of fibroblast pulp cell caused by single dosage ionizing radiation: in vivo.

This study is laboratory experimental research that use the Post-Test Control Group Design. The sample research was rats, wistar strain, male, 3–4 month of age, 150–200g of weight and healthy. There were 24 rats that were divided into 4 groups of 6 rats: the first group was used as a control group (no radiation or 0 rad radiation); the second, the third and the fourth group were consecutively induced by 100, 200 and 400 rad single dosage radiation. The source of radiation was Cobalt 60 that was exposed to the head of each rat. The entire sample was hereinafter sacrificed 24 hours after radiation exposure, and the lower incisors were taken for histopathology specimen processed. The detection of apoptotic using the TUNEL Assay method, so the specimens were stained with histochemical technique using *S7101 Apoptag Plus Peroxidase In Situ Apoptosis Detection Kit*. The apoptotic of fibroblast pulp cells were counted under light microscope in the magnification of 400x, by three competence observers with blind test technique. Observation and counting of apoptotic cells (percentage method) were conducted at two sides (labial and palatal side of the teeth) below odontogenic and free-cell zone, then the mean value of the result of the counting were taken. The data were statistically analyzed using one-way ANOVA and LSD test at significant level (α) of 0.05.

The results of this study indicated that there were significant percentage increasing the apoptotic of fibroblast pulp cell followed by increasing the radiation dosage of 0, 100 and 200 rad, but the percentage was then decreasing significantly at 400 rad radiation dosage. The one-way ANOVA test proved that there was a significant difference the apoptotic percentage of fibroblast pulp cell among the four groups ($p < 0.05$).

The conclusion of this study was the percentage increasing the apoptotic of fibroblast pulp cell was followed by the increasing of radiation dosage 0, 100 and 200 rad, but the decreasing of these was occurred after using 400 rad radiation dosage. The apoptotic decreasing at 400 rad radiation dosage was supposed to caused the increasing of another cell death form, that is necrosis.

ABSTRACT

SINGLE DOSAGE IONIZING RADIATION EFFECT ON APOPTOTIC OF FIBROBLAST PULP CELL

(Laboratory experimental research on *ratus norvegicus wistar* strain)

Supriyadi

OBJECTIVE. The purpose of this study was to prove the apoptotic increasing of fibroblas pulp cell caused by single dosage ionizing radiation: *in vivo*.

MATERIAL AND METHODE. This study is laboratory experimental research that use the Post-Test Control Group Design. The sample research was rats, wistar strain, male, 3–4 month of age, 150– 200g of weight and healthy. There were 24 rats that were divided into 4 groups of 6 rats: the first group was used as a control group (no radiation or 0 rad radiation); the second, the third and the forth group were consecutively induced by 100, 200 and 400 rad single dosage radiation. The source of radiation was Cobalt 60 that was exposed to the head of each rat. The entire sample was hereinafter sacrificed 24 hours after radiation exposure, and the lower insicivus were taken for histopatology specimen processed . The detection of apoptotic using the TUNEL Assay method, so the specimens were stained with histochemical technique using *S7101 Apoptag Plus Peroxidase In Situ Apoptosis Detection Kit*. The apoptotic of fibroblast pulp cells were counted under light microscope in the magnification of 400x, by three competence observers with blind test technique. Observation and counting of apoptotic cells (percentage mathod) were conducted at two sides (labial and palatal side of the teeth) below odontogenic and free-cell zone, then the mean value of the result of the counting were taken. The data were statistically analyzed using one-way ANOVA and LSD test at significant level (α) of 0.05.

RESULTS. The results of this study indicated that there were significant percentage increasing the apoptotic of fibroblast pulp cell followed by increasing the radiation dosage of 0, 100 and 200 rad, but the percentage was then decreasing significantly at 400 rad radiation dosage. The one-way ANOVA test proved that there was a significant difference the apoptotic percentage of fibroblast pulp cell among the four groups ($p < 0.05$).

CONCLUSION. The conclusion of this study was the percentage increasing the apoptotic of fibroblast pulp cell was followed by the increasing of radiation dosage 0, 100 and 200 rad, but the decreasing of these was occurred after using 400 rad radiation dosage. The apoptotic decreasing at 400 rad radiation dosage was supposed to caused the increasing of another cell death form, that is necrosis

Key word : ionizing radiation, apoptotic, fibroblast pulp cell



DAFTAR ISI

	Halaman
Sampul Depan	i
Sampul Dalam	ii
Prasyarat Gelar	iii
Halaman Pengesahan	iv
Penetapan Panitia Penguji.....	v
Ucapan Terima Kasih	vi
Ringkasan	ix
Summary	xi
Abstract	xii
Daftar Isi	xiii
Daftar Tabel	xv
Daftar Gambar	xvi
Daftar Singkatan	xvii
Daftar Lampiran	xix
BAB 1 PENDAHULUAN	1
1.1 Latar Belakang Masalah	1
1.2 Rumusan Masalah	6
1.3 Tujuan Penelitian	6
1.4 Manfaat Penelitian	7
BAB 2 TINJAUAN PUSTAKA	8
2.1 Radiasi Ionisasi	8
2.2 Efek Biologis Radiasi Ionisasi	10
2.2.1 Efek biologis radiasi ionisasi pada tingkat molekuler	11
a. Efek radiasi pada DNA	12
b. Efek radiasi pada protein	13
c. Efek radiasi pada lipid	15
d. Efek radiasi pada karbohidrat	16
2.2.2 Efek biologis radiasi ionisasi pada tingkat seluler	16
a. Nekrosis	18
b. Apoptosis	19
a) Peran p53 dalam proses apoptosis.....	23
b) Protein kelompok Bcl-2	25
2.2.3 Efek biologis radiasi ionisasi pada tingkat jaringan dan organ	27
2.2.4 Efek biologis radiasi ionisasi pada tingkat seluruh tubuh	27
2.3 Pulpa Gigi	28
2.4 Fibroblas Jaringan Pulpa	30
2.5 Rat sebagai Binatang Coba untuk Penelitian Laboratoris...	33

BAB 3 KERANGKA KONSEPTUAL DAN HIPOTESIS PENELITIAN	36
3.1 Kerangka Konseptual Penelitian	36
3.2 Penjelasan Kerangka Konseptual	37
3.3 Hipotesis Penelitian	38
BAB 4 METODE PENELITIAN	39
4.1 Jenis dan Rancangan Penelitian	39
4.2 Populasi dan Sampel.....	39
4.3 Variabel Penelitian	40
4.3.1 Klasifikasi variabel	40
4.3.2 Definisi operasional variabel	41
4.4 Unit Analisis	41
4.5 Bahan Penelitian	42
4.6 Alat Penelitian	42
4.7 Lokasi dan Waktu Penelitian	43
4.8 Prosedur Pelaksanaan Penelitian	44
4.8.1 Persiapan binatang coba	44
4.8.2 Pemberian paparan radiasi	44
4.8.3 Pengambilan gigi dari binatang coba	45
4.8.4 Pembuatan Sediaan Histopatologis	45
4.8.5 Pewarnaan	45
4.8.6 Pengamatan dan penghitungan sel apoptosis	45
4.9 Analisis Data	46
4.10 Kerangka Operasional Penelitian	47
BAB 5. ANALISIS HASIL PENELITIAN	48
5.1 Data Penelitian	4
5.2 Analisis Data Hasil Penelitian.....	53
BAB 6. PEMBAHASAN	56
BAB 7. KESIMPULAN DAN SARAN	69
7.1 Kesimpulan.....	67
7.2 Saran	67
DAFTAR PUSTAKA	70
LAMPIRAN	75

DAFTAR TABEL

	Halaman
Tabel 2.1 Perbedaan apoptosis dan nekrosis	22
Tabel 5.1 Rerata persentase sel fibroblas jaringan pulpa yang mengalami apoptosis akibat radiasi ionisasi dosis tunggal yang diamati setelah 24 jam dari radiasi	49
Tabel 5.2 Analisis <i>Least Significant different</i> (LSD) antar kelompok sampel	55

DAFTAR GAMBAR

	Halaman
Gambar 2.1 Gambar skematik peristiwa apoptosis.....	21
Gambar 2.2 Rangkaian perubahan ultrastruktur pada sel nekrosis dan Apoptosis.....	23
Gambar 2.3 Diagram rongga pulpa gigi bagian koronal. Lapisan odontoblas, <i>cell-free zone</i> dan <i>cell-rich zone</i> terdapat pada bagian tepi pulpa	29
Gambar 2.4 Diagram zona odontogenik pulpa. Fibroblas terdapat Pada <i>cell-rich zone</i>	30
Gambar 2.5 Sel Fibroblas	32
Gambar 3.1 Bagan alur kerangka konseptual penelitian	36
Gambar 4.1 Skema rancangan penelitian	39
Gambar 4.2 Bagan alur kerangka operasional penelitian	47
Gambar 5.1 Diagram batang rerata persentase sel fibroblas jaringan pulpa yang mengalami apoptosis akibat radiasi ionisasi dosis tunggal yang berbeda yang diamati setelah 24 jam dari radiasi	49
Gambar 5.2 Hasil pewarnaan dengan <i>Apoptag Detection Kit</i> pada Kelompok 1 atau kontrol (radiasi 0 rad) (pembesaran 1000 kali).....	51
Gambar 5.3 Hasil pewarnaan dengan <i>Apoptag Detection Kit</i> pada kelompok 2 (radiasi dosis tunggal 100 rad) (pembesaran 1000 kali)	51
Gambar 5.4 Hasil pewarnaan dengan <i>Apoptag Detection Kit</i> pada kelompok 3 (radiasi dosis tunggal 200 rad) (pembesaran 1000 kali).....	52
Gambar 5.5 Hasil pewarnaan dengan <i>Apoptag Detection Kit</i> pada Kelompok 4 (radiasi dosis tunggal 400 rad) (pembesaran 1000 kali)	52

DAFTAR SINGKATAN

A°	= <i>angstrom</i>
AIF	= <i>activating inducing factor</i>
Apaf-1	= <i>apoptotic protease activating factor</i>
ATM	= <i>ataxia telengactasia mutant</i>
ATP	= <i>adenosin triphosphat</i>
Caspase	= <i>cystein asparatyl specific protease</i>
Ced	= <i>caenorhabditis elegans death</i>
CIP-1	= <i>CDK-interacting protein</i>
dH ₂ O	= <i>deionized water</i>
DNA	= <i>deoxyribonucleic acid</i>
e _{aq}	= <i>hidrated electron</i>
Fas L	= <i>fas ligand</i>
GADD-45	= <i>growth-arrest DNA damage</i>
G1	= <i>gap 1</i>
H	= <i>hydrogen</i>
H ₂ O ₂	= <i>hydrogen peroksida</i>
HO ₂	= <i>hidroperoksida</i>
ICRC	= <i>international committee on radiation protection</i>
LSD	= <i>least significant different</i>
MDM2	= <i>mouse double minute no.2</i>
MPTP	= <i>mitochondrial permeability transition pore</i>

MT	= mutant
OH	= hidroksil
p21	= <i>protein 21</i>
p53	= <i>protein 53</i>
pRb	= <i>protein retinoblastoma</i>
RER	= <i>rough endoplasmic reticulum</i>
RNA	= <i>rybonucleic acid</i>
S	= <i>sintesis</i>
-SH	= <i>sulfidril</i>
TNF- α	= <i>tumor necrosis factor</i>
TUNEL Assay	= <i>terminal deoxyuridine nucleotide end labelling assay</i>
WAF 1	= <i>wild type 53 activated fragment 1</i>
WHO	= <i>word health organization</i>
WT	= <i>wild type</i>

DAFTAR LAMPIRAN

	Halaman
Lampiran 1. Perhitungan besar sampel	75
Lampiran 2. Teknik pemrosesan jaringan dengan teknik rutin untuk pembuatan sediaan histologi	76
Lampiran 3. Prosedur pemrosesan jaringan dengan <i>S7101 Apoptag Plus Peroxidase In situ Apoptosis Detection Kit</i>	79
Lampiran 4. Data hasil penelitian	83
Lampiran 5. Uji normalitas, homogenitas dan <i>one-way anova</i> data hasil penelitian pengamat 1, 2 dan 3	85
Lampiran 6. Uji normalitas, homogenitas dan <i>one-way anova</i> data hasil penelitian pengamat 1	88
Lampiran 7. Uji statistik <i>Least Significant different</i> (LSD)	90

BAB 1

PENDAHULUAN

BAB 1

PENDAHULUAN

1.1 Latar Belakang

Penggunaan radiasi ionisasi di kedokteran menempati urutan ke dua, yaitu sekitar 30,7% (Mould, 1985). Pemanfaatan radiasi ionisasi tersebut didasarkan pada sifat radiasi ionisasi yang dapat menembus benda atau medium, yang kemudian dimanfaatkan pada radiografi untuk tujuan diagnosis dan evaluasi perawatan. Sifat radiasi ionisasi yang lain yaitu dapat menimbulkan efek biologis pada sel dan jaringan hidup dimanfaatkan untuk tujuan pengobatan (radioterapi) berbagai jenis kanker (Rasad, 1999). Jumlah radioterapi kanker di daerah kepala dan leher cukup tinggi (Hasan dan Khier, 1997). Mengutip penelitian yang dilakukan Hendarti (2001), penderita yang mendapatkan terapi radiasi di daerah kepala dan leher di Rumah Sakit Umum Dr. Soetomo Surabaya selama tahun 1997 mencapai 2974 penderita.

Radioterapi dapat memberikan efek samping yang tidak diharapkan pada sel atau jaringan sehat di sekitar daerah sasaran radiasi. Efek samping radioterapi terjadi akibat efek biologis dari radiasi ionisasi. Efek biologis radiasi ionisasi terhadap sel adalah kematian sel (nekrosis dan apoptosis) sebagai efek jangka pendek dan transformasi keganasan sebagai efek jangka panjang. Bentuk efek biologis radiasi ionisasi terhadap sel tergantung pada dosis, lama paparan dan jenis sel yang terpapar (Cotran, 1999). Apoptosis adalah bentuk kematian sel yang berbeda dengan nekrosis. Apoptosis adalah kematian sel yang terprogram; dapat



terjadi pada kondisi normal atau fisiologis maupun pada kondisi patologis (Cotran, 1999).

Efek samping yang sudah umum terjadi pada radioterapi kanker di daerah kepala dan leher adalah peningkatan insidensi karies gigi sebagai akibat lanjut dari xerostomia. Efek samping yang lain adalah peningkatan kecepatan perkembangan karies gigi dan kerusakan gigi yang lain (Goaz dan White, 1987; Lukman, 1991). Hal ini diduga karena radiasi ionisasi juga mengakibatkan kematian sel dalam jaringan pulpa. Kematian sel jaringan pulpa jenis nekrosis telah diungkap, namun kematian sel dalam jaringan pulpa jenis apoptosis khususnya secara *in-vivo* belum pernah dibuktikan.

Kematian sel jaringan pulpa jenis apoptosis khususnya secara *in-vivo* akibat radiasi ionisasi sangat penting untuk diketahui dalam rangka untuk pencegahan, membuat prognosis dan patogenesis perkembangan karies gigi dan kerusakan gigi yang lain, terutama pada pasien yang mendapat terapi radiasi. Jaringan pulpa dan berbagai jenis sel yang ada di dalam jaringan pulpa mempunyai peran sangat penting dalam menghambat berbagai macam jejas dari luar gigi terutama karies gigi. Jaringan pulpa di daerah kompleks dentin-pulpa mempunyai 3 mekanisme pertahanan, yaitu pembentukan dentin sklerotik, dentin reparatif dan reaksi inflamasi. Ketiga mekanisme pertahanan pulpa tersebut sangat tergantung pada vitalitas jaringan pulpa (Kidd dan Bechal, 1992).

Fibroblas atau *undifferentiated cell* adalah salah satu sel dalam jaringan pulpa yang mempunyai jumlah paling banyak dan mempunyai peran sangat penting dalam menjaga integritas dan vitalitas jaringan pulpa. Fibroblas

mempunyai fungsi utama dalam membentuk dan mempertahankan matriks jaringan pulpa, yaitu dengan membentuk *ground substance* dan serat kolagen (Bhaskar, 1990). Fibroblas adalah *ameloblast and odontoblast precursor cell* yang dapat berubah menjadi ameloblas atau odontoblas tergantung jenis stimulus yang diterima (Roth dan Calmes, 1991). Odontoblas mempunyai peran penting dalam pembentukan dentin terutama dentin reparatif dan dentin sklerotik sehingga perkembangan karies dan iritan lain ke jaringan pulpa dapat dihambat (Kidd dan Bechal, 1992). Fibroblas mempunyai tingkat radiosensitifitas yang lebih tinggi dibandingkan odontoblas. Fibroblas dalam jaringan pulpa adalah sel yang sangat aktif berproliferasi. Menurut hukum "Bergonie dan Tribondeau", radiosensitivitas jaringan berbanding terbalik dengan derajat diferensiasinya. Berdasarkan ini maka sel yang aktif berproliferasi adalah lebih radiosensitif (Koppang, 1973; Roth dan Calmes, 1981; Lawler, 1992).

Beberapa penelitian mengenai efek radiasi ionisasi terhadap sel dalam jaringan pulpa pernah dilakukan, baik secara *in-vitro* maupun *in-vivo*. Efek radiasi ionisasi terhadap sel fibroblas atau *odontoblast precursor cell* menunjukkan ada kerusakan sel, piknosis dan kariolisis pada zona proliferasi basal mesenkimal pulpa. Kerusakan sel tersebut diamati beberapa jam setelah paparan radiasi *Hard X-ray* dengan dosis dibawah 100 rad. Pada penelitian lain, radiasi ionisasi menyebabkan sel odontoblas mengalami disorganisasi, perubahan morfologi, perubahan fungsi sekretori dan pembentukan dentin yang abnormal (Kimeldorf, 1963; Farris dan Griffith, 1971; Morse, 1991). Penelitian lain oleh Pratama (1994), menunjukkan bahwa radiasi ionisasi dapat menyebabkan

perubahan morfologi inti sel odontoblas, yaitu piknosis, kariereksis dan kariolisis. Penelitian mengenai efek radiasi terhadap sel fibroblas secara *in vitro* pada kultur sel pernah dilakukan oleh Dulic (1994), Gadbois (1996) dan Dimitrijevic-Bussod (1999). Mereka mendapatkan peningkatan ekspresi *p53*, siklus sel berhenti pada tahap G1 dan apoptosis.

Ada dua teori mengenai efek biologis radiasi ionisasi terhadap kerusakan sel atau jaringan hidup, yaitu teori aksi langsung (teori target) dan teori aksi tidak langsung (Goaz dan White, 1987). Pada teori aksi langsung yang menjadi target adalah atom dari molekul spesifik. Jumlah molekul spesifik ini dalam sel biasanya sangat sedikit, tetapi sangat penting bagi sel. Baik pada sel somatik maupun sel genetik, target aksi langsung radiasi ionisasi adalah *deoxyribonucleic acid* (DNA). DNA adalah struktur sub-sel yang sangat peka terhadap radiasi pengion, maka pada sel yang terpapar radiasi dapat terjadi kerusakan DNA sebelum kerusakan struktur sub-sel yang lain (Bushong, 1998). Pada teori aksi tidak langsung, kerusakan sel disebabkan oleh radikal bebas. Radikal bebas tersebut dihasilkan melalui proses ionisasi atau hidrolisis molekul air akibat paparan radiasi ionisasi. Kandungan molekul air dalam setiap sel hidup adalah yang paling besar, yaitu mencapai 80%. Radiolisis molekul air akan menghasilkan radikal bebas hidrogen (H^*), *hydrated electron* (e_{aq}) dan terutama yang paling berbahaya adalah radikal bebas hidroksil (OH^*). Radikal bebas hidroksil dapat saling bergabung membentuk senyawa hidrogen peroksida (H_2O_2). Radikal hidrogen juga dapat bergabung dengan oksigen membentuk radikal hidroperoksida (HO_2^*). Dalam tubuh radikal bebas tersebut sangat tidak stabil dan sangat reaktif, berumur

pendek sekitar 1 milidetik tetapi mempunyai energi yang berlebihan, sehingga dapat merusak setiap sel yang dijumpai, kemudian menyebar ke seluruh bagian sel dan berinteraksi dengan berbagai macam molekul penting dalam sel seperti DNA, RNA, protein, lipid, karbohidrat dan lain-lain (Edwards, 1990; Whaites dan Cawson, 1992; Bushong, 1998).

Kerusakan DNA akibat radiasi ionisasi baik melalui efek langsung maupun efek tidak langsung akan menyebabkan aktivasi protein *p53*. *p53* adalah protein yang berperan dalam regulasi proliferasi sel dan apoptosis. Protein *p53* yang teraktivasi selanjutnya akan menyebabkan aktivasi protein *p21* yang menyebabkan siklus sel berhenti. Protein *p53* yang teraktivasi juga akan menyebabkan aktivasi protein GADD45, yaitu protein yang bertanggung jawab terhadap perbaikan DNA. Apabila perbaikan kerusakan DNA berhasil, maka sel akan normal kembali; tetapi apabila perbaikan gagal, maka *p53* akan mengaktivasi gen pro-apoptosis (terutama *bax*) sehingga akan terjadi apoptosis (Cotran, 1999). Kerusakan atau fragmentasi DNA akibat radiasi ionisasi sebagai pencetus apoptosis dapat dideteksi dengan suatu metode yang khusus atau spesifik untuk deteksi sel yang apoptosis, diantaranya dengan metode *TUNEL Assay* menggunakan *Apoptag Kit*.

1.2 Rumusan Masalah

1. Apakah terjadi peningkatan apoptosis sel fibroblas jaringan pulpa akibat paparan radiasi ionisasi dosis tunggal 100 rad?
2. Apakah terjadi peningkatan apoptosis sel fibroblas jaringan pulpa akibat paparan radiasi ionisasi dosis tunggal 200 rad?
3. Apakah terjadi peningkatan apoptosis sel fibroblas jaringan pulpa akibat paparan radiasi ionisasi dosis tunggal 400 rad?
4. Apakah terdapat perbedaan peningkatan apoptosis sel fibroblas jaringan pulpa akibat paparan radiasi ionisasi diantara dosis radiasi tunggal 100 rad, 200 rad dan 400 rad?

1.3 Tujuan Penelitian

1.3.1 Tujuan umum

Untuk membuktikan peningkatan apoptosis sel fibroblas jaringan pulpa akibat paparan radiasi ionisasi dosis tunggal .

1.3.2 Tujuan khusus

1. Membuktikan peningkatan apoptosis sel fibroblas jaringan pulpa akibat paparan radiasi ionisasi dosis tunggal 100 rad.
2. Membuktikan peningkatan apoptosis sel fibroblas jaringan pulpa akibat paparan radiasi ionisasi dosis tunggal 200 rad.
3. Membuktikan peningkatan apoptosis sel fibroblas jaringan pulpa akibat paran radiasi ionisasi dosis tunggal 400 rad.

4. Untuk mengetahui perbedaan peningkatan apoptosis sel fibroblas jaringan pulpa akibat paparan radiasi ionisasi diantara dosis radiasi tunggal 100 rad, 200 rad dan 400 rad.

1.4 Manfaat Penelitian

1. Memberikan informasi ilmiah untuk melengkapi penjelasan mengenai efek radiasi ionisasi terhadap sel fibroblas jaringan pulpa.
2. Hasil penelitian dapat dijadikan dasar untuk meningkatkan usaha pencegahan proteksi dari efek radiasi ionisasi yang tidak diharapkan, misal dengan pembuatan alat proteksi radiasi khusus untuk gigi dan jaringan tubuh lain di sekitar daerah sasaran radiasi.

BAB 2

TINJAUAN PUSTAKA

BAB 2

TINJAUAN PUSTAKA

2.1 Radiasi Ionisasi

Radiasi adalah pancaran energi dalam bentuk gelombang (Barr dan Stephens, 1980). Radiasi juga dapat dipahami sebagai proses pengeluaran energi radiasi dalam bentuk gelombang (partikel), atau proses kombinasi dari pengeluaran dan pancaran energi radiasi (Edwards, 1990).

Radiasi dapat dibagi menjadi dua kelompok, yaitu radiasi korpuskuler dan radiasi elektromagnetis. Radiasi korpuskuler adalah pancaran atau aliran atom atau partikel sub-atom yang mempunyai kemampuan untuk memindahkan energi gerak atau energi kinetik ke bahan atau medium yang dilalui. Radiasi elektromagnetis adalah pancaran gelombang (gabungan medan listrik dan magnet) yang dapat menyebabkan perubahan struktur dalam atom dari bahan atau medium yang dilalui (Amsyari, 1989). Termasuk radiasi elektromagnetis adalah listrik, radio, inframerah, cahaya, ultraviolet, sinar-X, sinar gamma dan sinar kosmik (Rasad, 1990).

Radiasi elektromagnetis mempunyai energi 60 KeV – 25 MeV (Hendrata, 2003). Radiasi elektromagnetis dapat dibagi menjadi 2 kelompok besar, yaitu 1) Radiasi dengan panjang gelombang yang sangat pendek (kurang dari 100 \AA). Radiasi ini mampu melakukan ionisasi apabila berbenturan dengan suatu bahan atau medium; contoh radiasi sinar-X dan sinar gamma. 2) Radiasi yang mempunyai panjang gelombang relatif tinggi (100 \AA atau lebih). Radiasi ini tidak

mampu melakukan ionisasi terhadap bahan atau medium yang dilalui (Amsyari, 1989; Edwards, 1990).

Interaksi radiasi dengan suatu bahan atau medium akan menghasilkan dua macam keadaan. Pertama, radiasi hanya bisa menyebabkan guncangan atom (*atomic excitation*) tanpa bisa menghasilkan ion dalam bahan atau medium yang dilalui; disebut radiasi non-ionisasi. Kedua, radiasi yang dapat membentuk partikel bermuatan positif atau negatif (ion) dari bahan atau medium yang dilalui; disebut radiasi ionisasi. Jadi radiasi ionisasi atau radiasi pengion adalah radiasi yang mampu menghasilkan ion dari bahan atau medium yang dilalui baik langsung maupun tidak langsung. Segala bentuk radiasi korpuskuler termasuk radiasi ionisasi dan hanya beberapa macam radiasi elektromagnetis termasuk radiasi ionisasi (Amsyari, 1989; Edwards, 1990).

Pada umumnya radiasi ionisasi berasal dari 2 sumber, yaitu radiasi alamiah dan radiasi buatan. Radiasi alamiah dapat berasal dari 4 sumber, yaitu radiasi sinar kosmis dari angkasa luar, radiasi yang berasal dari unsur-unsur kimiawi pada lapisan kerak bumi, radiasi yang terjadi pada atmosfer akibat pergeseran lintasan perputaran bola bumi dan radiasi yang berasal dari bahan radioaktif pada lapisan tanah. Radiasi buatan dihasilkan oleh alat khusus penghasil radiasi dengan menggunakan sumber bahan radioaktif tertentu, misal sinar X, sinar alfa, sinar beta, sinar laser dan sinar gamma.

Secara umum radiasi yang digunakan dalam dunia kedokteran berasal dari radiasi buatan (Amsyari, 1989), terutama adalah radiasi elektromagnetis. Jenis radiasi elektromagnetis yang sering digunakan untuk pengobatan berbagai jenis

kanker adalah sinar X dan sinar gamma. Sinar gamma dihasilkan dari alat penghasil sinar gamma dengan menggunakan unsur radioaktif seperti cobalt-60 dan uranium (Lukman, 1991). Radiasi sinar gamma mempunyai panjang gelombang 0,001 – 0,15 nm (Hassan dan Khier, 1997). Dosis radiasi yang digunakan pada radioterapi dapat dosis tunggal atau dosis fraksinasi (dosis terbagi), yaitu sebesar 200 rad yang diberikan berulang setiap 24 jam, lima kali seminggu selama lima minggu (Underwood, 1999).

Radiasi diukur dalam berbagai unit dosimetri. Dosimetri yang sering digunakan adalah *Roentgen*(R), *rad*, *gray* (Gy), *rem*(Rem) dan *sievert* (Sv). *Roentgen* adalah satuan radiasi sinar X atau sinar tembus lain, yaitu jumlah radiasi yang dikeluarkan pada satu cm kubik volume udara dengan tekanan tertentu; 1 R ~ 1mR. *Rad* adalah satuan radiasi yang diserap oleh benda atau zat yang terpapar radiasi; 1 Rad ~ 1 Gy. *Rem* adalah dosis radiasi yang menyebabkan efek biologi setara dengan sinar X atau sinar gamma sebesar 1 Rad. *Sievert* adalah satuan radiasi yang menyebabkan efek biologis setara dengan sinar X atau sinar gamma sebesar 1 Gy; 1 Sv ~ 100 Rem (Lukman, 1991; Cotran, 1999).

2.2 Efek Biologis Radiasi Ionisasi

World Health Organization (WHO) telah mengemukakan dua konsep mengenai efek spesifik akibat paparan radiasi. Konsep pertama menyatakan bahwa pengaruh radiasi terhadap kerusakan jaringan bersifat kumulatif. Konsep kedua menyatakan bahwa setiap paparan radiasi mempunyai efek merusak sel atau jaringan hidup (Sudira, 1989). *International Committee on radiation*

Protection (ICRP) juga telah mengemukakan suatu konsep bahwa tidak ada dosis radiasi bebas bahaya (*Threshold dose*); semua jenis radiasi ionisasi dapat menyebabkan perubahan pada sel (Amsyari, 1989).

Kerusakan biologis akibat radiasi ionisasi dapat dilihat dalam empat tingkat, yaitu pada tingkat molekuler, seluler, organik, dan seluruh tubuh. Kerusakan biologis akibat radiasi ionisasi pada tingkat organik atau seluler selalu dimulai dengan kerusakan pada tingkat molekuler (Edwards, 1990; Bushong, 1998).

2.2.1 Efek biologis radiasi ionisasi pada tingkat molekuler

Interaksi radiasi ionisasi pada tingkat molekuler terjadi melalui efek langsung dan efek tidak langsung. Efek langsung atau target langsung radiasi ionisasi adalah molekul spesifik. Dalam sel, molekul spesifik ini biasanya terdapat dalam jumlah sedikit tetapi sangat penting bagi sel. *Deoxyribonucleic acid (DNA)* adalah target utama radiasi ionisasi; baik pada sel somatik maupun genetik (Bushong, 1998). Target molekul yang lain adalah RNA, protein dan enzim, lipid, karbohidrat dan lain-lain. Ionisasi dari makromolekul ini akan menyebabkan ikatan kimia makromolekul tersebut pecah, sehingga akan menjadi struktur yang tidak normal dan menimbulkan reaksi kimia yang tidak tepat (Edwards, 1992).

Efek tidak langsung radiasi ionisasi terjadi melalui pembentukan radikal bebas. Radikal bebas adalah senyawa kimia yang mempunyai satu pasang elektron tidak berpasangan pada kulit yang paling luar. Dua radikal bebas bertemu dapat menggabungkan elektron yang tidak berpasangan tersebut untuk membentuk

ikatan kovalen. Radikal bebas mempunyai dua sifat, yaitu 1) mempunyai reaktifitas yang tinggi karena mempunyai kecenderungan menarik elektron dari molekul lain; dan 2) dapat mengubah suatu molekul yang dijumpai menjadi radikal bebas baru sehingga dapat terjadi reaksi rantai. Radikal bebas adalah molekul yang tidak stabil dan berumur pendek (Suryohudoyo, 2000). Radikal bebas hanya bertahan (*exist*) dalam sel kurang dari 1 mikrodetik tetapi mempunyai energi yang berlebihan dan dapat menyebar ke seluruh bagian sel dan merusak ikatan molekul dalam sel tersebut. Pada efek biologis radiasi, radikal bebas adalah hasil utama dari interaksi radiasi ionisasi dengan molekul air. Dalam setiap sel tubuh kandungan molekul air adalah paling tinggi, yaitu sekitar 80% (Edwards, 1990; Bushong, 1998).

a. Efek radiasi pada DNA

DNA adalah target utama dari radiasi ionisasi baik melalui aksi langsung maupun aksi tidak langsung sehingga dapat terjadi kerusakan (Bushong, 1998). Kerusakan DNA yang disebabkan oleh berbagai jenis radiasi dapat berupa: rantai DNA putus baik rantai tunggal maupun ganda, oksidasi dan degradasi basa DNA, ikatan gula-phosphat putus dan ikatan silang protein (Cotran, 1999; Underwood, 1999). Kerusakan tersebut sebagian besar terjadi melalui efek tidak langsung, yaitu oleh radikal bebas yang dihasilkan oleh proses radiolisis molekul air dalam sel (Edwards, 1990).



Apabila hanya satu rantai DNA yang putus perbaikan umumnya berlangsung dengan baik, tetapi apabila dua rantai DNA yang putus tidak mungkin terjadi perbaikan karena tidak ada dasar sambungannya dan akan terjadi kematian sel (Edwards, 1990; Underwood, 1999). Apabila terjadi perubahan dasar, maka rantai DNA tidak dapat lagi menyalin secara benar, sehingga menghasilkan salinan yang tidak dapat dibaca atau dibaca salah. Rantai DNA yang saling berikatan silang akan mengakibatkan ketidakmampuan untuk pemisahan sehingga tidak dapat membuat salinan baru dan replikasi mengalami hambatan (Underwood, 1999).

Basa pirimidin lebih radiosensitif daripada basa purin dan basa timin lebih radiosensitif daripada basa primidin. Suatu perubahan dalam rangkaian basa DNA kemungkinan besar dapat menyebabkan perubahan genetik atau mutasi (Casarett, 1968; Upton, 1982). Reaksi radikal bebas dengan timin dalam inti dan mitokondria menghasilkan kerusakan *single strand* DNA yang dapat berimplikasi pada sel dan dalam transformasi *malignant* (Cotran, 1999).

b. Efek radiasi terhadap protein

Gugus amino adalah bagian yang paling radiosensitif dari asam amino. Dalam suatu protein, gugus amino dihubungkan dengan gugus karboksil. Rantai samping (*side chain*) adalah bagian yang lebih radiosensitif dari molekul protein. Komposisi kimia protein sangat menentukan berbagai

perubahan spesifik dalam rantai samping (Cassarett, 1968, De Robertis, 1980).

Radikal bebas dapat menyebabkan fragmentasi protein melalui proses oksidasi asam amino pada rantai samping, pembentukan protein *cross-linkage* (contoh *sulfidril mediated*), dan oksidasi *protein backbone*. *Oxidative modification* protein akan meningkatkan degradasi enzim yang kritis oleh *multy catalytic proteosome complex* sehingga akan meningkatkan kerusakan menyeluruh dalam sel (Cotran, 1999)

Fungsi protein yang hilang akibat radiasi biasanya disebabkan oleh ikatan peptida yang putus atau sebaliknya terjadi gangguan bentuk rangka primer dari rantai peptida. Dapat pula terjadi perubahan rantai samping yang kritis dan ikatan hidrogen atau ikatan disulfida yang mempertahankan bentuk sekunder dan tersier protein terputus. Keadaan demikian akan membuka sebagian gulungan rantai peptida sehingga dapat terjadi kekacauan struktur internal protein. Perpanjangan gugus rantai samping atau gugus asam amino yang terbuka akan mengakibatkan perubahan aktifitas kimia dari protein. Radiasi juga dapat menghasilkan perubahan lain pada protein seperti penambahan atau pengurangan viskositas, perubahan dalam indeks bias, putaran optik dan hantaran listrik (Cassarett, 1968, De Robertis, 1980).

Enzim adalah protein yang mengkatalis reaksi kimia yang spesifik. Semua enzim dapat terjadi inaktivasi ketika terkena paparan radiasi. Diperkirakan enzim yang banyak mengandung gugus sulfidril (-SH) lebih

sensitif daripada enzim yang tidak mengandung gugus sulfidril, karena sulfur yang terkandung dalam enzim sangat esensial untuk proses dalam sel. Dosis radiasi yang kecil sampai sedang dapat menurunkan aktivitas katalase dalam berbagai jaringan (Cassarett, 1968; De Robertis, 1980).

Suatu enzim yang mengalami kerusakan akibat radiasi, maka reaksi biokimia yang melibatkan enzim tersebut tidak dapat terjadi dengan tepat. Bila reaksi ini merupakan reaksi sintesa protein tertentu, maka protein tersebut tidak akan terbentuk. Protein di dalam tubuh mempunyai fungsi yang tertentu (khusus), maka jika protein tertentu tersebut tidak terbentuk akibat radiasi, maka fungsi tersebut akan terganggu. Gangguan fungsi tertentu di dalam sel akan menyebabkan gangguan pada fungsi yang lain. Gangguan fungsi dalam sel sampai batas tertentu akan menyebabkan kerusakan sel (Edwards, 1990).

c. Efek radiasi terhadap lipid

Lipid merupakan molekul penting dalam sel yang berfungsi sebagai nutrisi dan unsur rangka. Reaksi yang paling penting dari lipid yang terpapar radiasi adalah pada komponen asam lemak, terutama asam lemak tak jenuh dengan dua atau lebih ikatan (Casarett, 1968).

Suatu radikal bebas derivat oksigen seperti radikal bebas hidroksil (OH^*) dapat menyebabkan peroksidase lipid dalam membran plasma dan membran organel. Kerusakan tersebut diinisiasi ketika ikatan rangkap dari asam lemak tak jenuh dari membran lipid terkena radikal bebas. Interaksi

lipid-radikal bebas akan menghasilkan peroksid yang tidak stabil dan sangat reaktif, kemudian dapat terjadi reaksi berantai otokatalitik yang dapat menghasilkan kerusakan luas pada membran, organel dan sel (Cotran, 1999).

d. Efek radiasi terhadap karbohidrat

Efek radiasi terhadap polisakarida memungkinkan terjadi degradasi rantai polisakarida, depolimerisasi bagian polisakarida dan depolimerisasi kompleks asam hialuronik. Penyinaran pada gula dalam suatu larutan yang encer tanpa oksigen menghasilkan bentuk primer; ini diakibatkan oleh *cross linking*, sedangkan penyinaran dengan dosis tinggi akan menghasilkan berbagai macam degradasi gula (Casarett, 1968).

2.2.2 Efek biologis radiasi ionisasi pada tingkat seluler

Setiap sel manusia mempunyai dua bagian utama, yaitu inti sel dan sitoplasma. Sitoplasma adalah sangat radioresisten karena target molekul DNA tidak berada di dalam sitoplasma tetapi berada di dalam inti sel, oleh karena itu inti sel sangat radiosensitif. Radiasi sebesar 100 rad sudah cukup untuk menyebabkan kematian sel, sedangkan sitoplasma membutuhkan dosis radiasi mendekati 1000 rad untuk dapat menyebabkan kematian sel (Bushong, 1998).

Radiasi dapat menyebabkan kerusakan sel melalui efek langsung dan efek tidak langsung. Efek tidak langsung adalah melalui pembentukan radikal bebas yang dihasilkan oleh ionisasi molekul air (Bushong, 1998). Efek biologis radiasi terhadap sel adalah kematian sel (nekrosis atau apoptosis) sebagai efek jangka

pendek dan transformasi keganasan sebagai efek jangka panjang (Cotran, 1999). Kematian sel (*cell death*) dapat terjadi karena suatu jejas telah melewati batas ambang adaptasi suatu sel, sehingga sel tidak mampu lagi melakukan adaptasi terhadap perubahan yang terjadi. Kematian sel terjadi karena suatu jejas telah menyebabkan keadaan sel sampai pada "*point of no return*". Penyebab kematian sel antara lain: *oxygen deprivation* terutama hipoksia, agen fisik (trauma, perubahan temperatur, radiasi, elektrik dan tekanan), agen kimia dan obat, agen infeksi, reaksi imunologis dan *genetik derangements* (Underwood, 1994).

Kematian sel akibat radiasi dapat berupa nekrosis atau apoptosis; tergantung pada dosis dan lama radiasi diberikan serta tergantung dari kecepatan proses kematian sel. Sebagai contoh jejas panas, radiasi, obat anti kanker dan hipoksia dapat menyebabkan apoptosis jika diberikan dalam dosis sedang, tetapi jika dosis yang diberikan besar dari stimulus yang sama akan menghasilkan nekrosis (Cotran, 1999). Pengaruh radiasi terhadap sel juga tergantung pada tingkat proliferasi sel. Menurut hukum "Bergonie dan Tribondeau", sensitifitas jaringan terhadap radiasi ionisasi berbanding terbalik dengan derajat diferensiasinya. Berdasarkan hukum ini, maka sel yang berproliferasi lebih cepat adalah sangat radiosensitif; tetapi tidak semua sel yang berproliferasi mempunyai radiosensitifitas yang sama. Sel pada keadaan mitosis lebih radiosensitif daripada fase sintetik DNA (tahap S) dari siklus sel (Lawler, 1992); sedangkan menurut Cotran (1999) fase yang paling sensitif terhadap radiasi adalah fase G₂ dan M, sedangkan fase yang lain berperan dalam respons adaptasi dan perbaikan.

a. Nekrosis

Nekrosis adalah bentuk umum dari kematian sel yang tidak terikat oleh faktor penyebab. Nekrosis bersifat pasif dan merupakan proses patologis yang terjadi akibat respon terhadap faktor dari luar seperti peradangan, iskemia atau bahan beracun (Underwood, 1999). Nekrosis terjadi akibat aksi degradasi yang progresif oleh enzim katalitik pada sel yang mengalami jejas dengan stimuli yang mematikan dan denaturasi protein sehingga terjadi lisis. Enzim katalitik ini dihasilkan oleh lisosom pada sel yang mengalami kematian (Cotran, 1999).

Manifestasi yang sering terlihat adalah nekrosis koagulasi; yang ditandai dengan denaturasi protein sitoplasma, organel sel pecah dan pembengkakan sel (Cotran, 1999). Pada nekrosis juga terlihat perubahan yang khas pada nukleus, yaitu mula-mula nukleus mengkerut, terjadi penggumpalan dan peningkatan densitas kromatin (piknosis). Perubahan berikutnya, membran nukleus robek dan meninggalkan pecahan kromatin yang tersebar di dalam sel (karioreksis). Bahan nukleus selanjutnya akan tercerna dan hilang (kariolisis) difagosit oleh neutrofil dan makrofag (Lawler, 1992; Cotran, 1999). Akibat sel yang lisis, maka pada proses nekrosis akan merangsang reaksi inflamasi akibat pelepasan isi sel ke dalam jaringan (Sukmawan, 2001).

Pada sel yang terkena paparan radiasi ionisasi, nekrosis terjadi karena radikal bebas merusak molekul pembentuk membran sel. Kerusakan molekul pembentuk membran sel ini akan mengakibatkan permeabilitas

membran sel terganggu, mengakibatkan air dan cairan lain dapat masuk dan terakumulasi ke dalam sel, akhirnya sel akan mati (Cotran, 1999).

b. Apoptosis

Istilah apoptosis pertama kali dikenal pada tahun 1972. Apoptosis berasal dari bahasa Yunani yang berarti "falling off". Apoptosis secara umum dapat terjadi selama perkembangan, sebagai mekanisme homeostasis untuk menjaga atau memelihara populasi sel dalam jaringan, sebagai mekanisme pertahanan apabila sel mengalami kerusakan akibat suatu penyakit atau bahan racun dan pada proses penuaan (Cotran, 1999).

Apoptosis adalah bentuk kematian sel yang terprogram (*programmed cell death*) dan merupakan proses yang normal pada embriogenesis dan homeostasis untuk kelangsungan hidup organisme. Melalui proses apoptosis, sel yang rusak akan dieliminasi, sedangkan sel yang masih berfungsi baik akan dibiarkan tetap berproliferasi sehingga dapat melindungi organisme atau tubuh dari kerusakan. Kontrol yang hilang pada proses apoptosis mempunyai peran penting pada proses transformasi keganasan (Kerr, 1994; Robens, 2001). Apoptosis dapat direspon secara fisiologis, adaptif dan patologis. Apoptosis disebabkan oleh suatu stimulus dengan dosis yang relatif kecil dibandingkan stimulus yang menyebabkan nekrosis (Cotran, 1999).

Apoptosis merupakan mekanisme kematian sel yang fisiologis, tetapi juga dapat terjadi pada kondisi patologis. Apoptosis kadang-kadang disertai

dengan nekrosis. Apoptosis dirancang untuk mengeliminasi sel host yang tidak diinginkan melalui aktivasi gen yang terkoordinasi dan terprogram secara internal (Cotran, 1999).

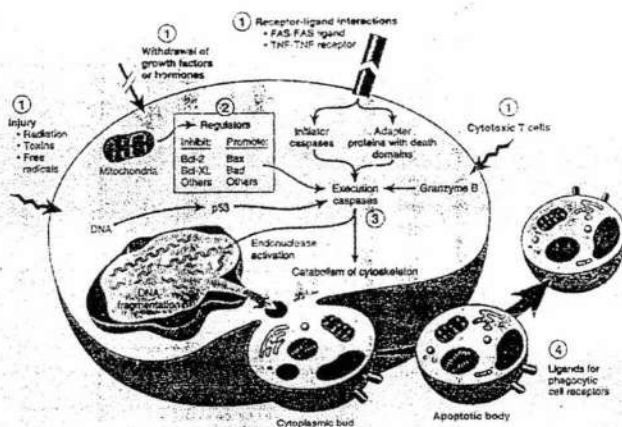
Apoptosis dikendalikan oleh berbagai protein terutama kelompok protein *Bcl-2*. Kelompok protein *Bcl-2* dikelompokkan menjadi dua, yaitu kelompok protein pro-apoptosis dan kelompok protein anti-apoptosis. Selain itu terdapat serangkaian kelompok protein *caspase*. *Caspase* yang satu akan mengaktifkan *caspase* yang lain sehingga membentuk *cascade-caspase* untuk memulai proses apoptosis (Tauhid dan Indra, 2000; Renehan, 2001; Robens, 2001).

Kelompok protein *Bcl-2* yang pro-apoptosis akan bertindak meningkatkan permeabilitas membran mitokondria sehingga mengakibatkan *cytochrom-c* terlepas. *Cytochrom-c* yang terlepas akan berikatan dengan *apoptotic protease activating factor-1 (apaf-1)* yang selanjutnya akan menginduksi inisiator *caspase*. Kelompok protein *Bcl-2* yang anti-apoptosis akan menghambat apoptosis melalui dua cara, yaitu bereaksi langsung pada mitokondria untuk mencegah peningkatan permeabilitas mitokondria sehingga mencegah *cytochrom-c* terlepas dan menghambat *apaf-1* menginduksi *caspase* meskipun *cytochrom-c* terlepas. Permeabilitas mitokondria ditentukan oleh perbandingan relatif anggota pro-apoptosis dan anti-apoptosis dari golongan *Bcl-2* (Renehan, 2001).

Proses apoptosis dapat terjadi melalui 3 mekanisme yang berbeda, yaitu: 1) apoptosis yang terjadi karena adanya sinyal dari dalam sel (jalur

internal), yaitu melalui jalur mitokondria; 2) apoptosis karena adanya rangsangan dari luar sel (jalur eksternal), yaitu melalui jalur *death activators* yang berikatan dengan reseptor permukaan sel seperti *tumor necrosis factor* - α (TNF- α), *lymphotoxin* dan *fas ligand* (FasL); dan 3) apoptosis yang melalui jalur lain (tanpa adanya *caspase*), yaitu melalui *Apoptosis-Inducing factor* (AIF) misal yang terjadi pada *neuron* (Wang, 2001)

Proses apoptosis pada mamalia dapat dibagi menjadi 4 tahap yang saling tumpang tindih, yaitu: 1) *signaling pathway*, merupakan tahap inisiasi proses apoptosis; 2) *controle and integration stage*, merupakan tahap regulasi apoptosis, baik regulasi positif maupun negatif, menghambat atau mencegah apoptosis terjadi; tahap inilah yang menentukan hasil akhir.. Tahap 3) *a common-execution phase*, adalah tahap pelaksanaan program kematian sel yang melibatkan *protease caspase*; dan 4) *removal of death cell*, adalah tahap fagositosis sel yang mengalami apoptosis oleh sel sehat yang berdekatan (Cotran, 1999). Ke-4 tahap tersebut disajikan pada gambar 2.1 berikut ini.



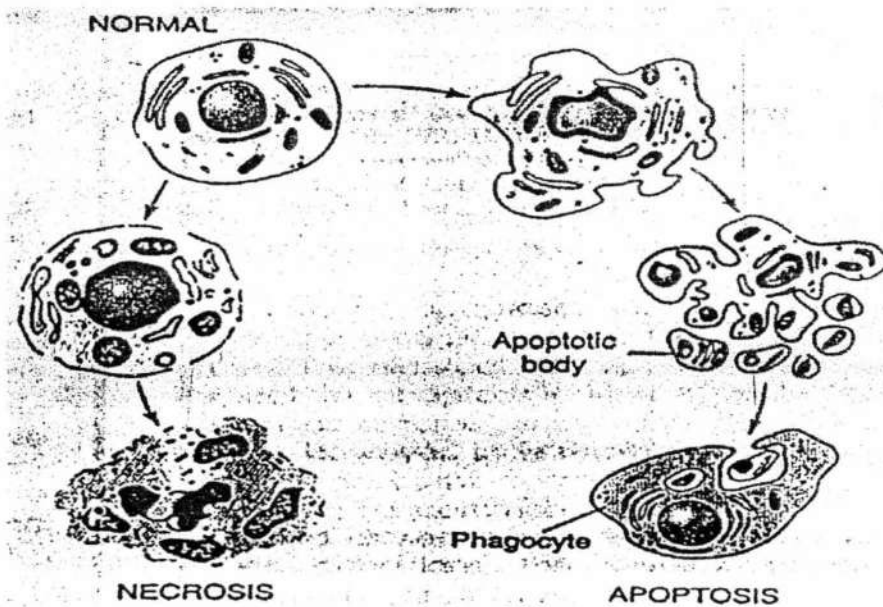
Gambar 2.1 Gambar skematik peristiwa apoptosis
(Sumber : Cotran dkk., 1999)

Pemeriksaan histologis yang diwarnai hematoksilin-eosin (HE) memperlihatkan apoptosis terjadi pada satu sel atau sejumlah kecil sel. Sel yang terjadi apoptosis terlihat sebagai masa yang bulat dengan sitoplasma easinofilik yang luas dan kromatin nukleus yang padat. Pembentukan *apoptotic bodies* terjadi dalam waktu yang cepat, fragmen ini dengan cepat akan difagositosis, dihancurkan atau dikeluarkan melalui lumen, menyebabkan sel apoptosis sulit dideteksi dengan cara histologi (Cohen, 1993; Cotran, 1999)

Manifestasi apoptosis adalah sesudah terjadi kondensasi nukleus, sel pecah menjadi beberapa bagian ikatan membran kecil dari bahan-bahan nukleus atau sitoplasma (*apoptotic bodies*). *Apoptotic bodies* ini kemudian akan difagosit oleh sel sehat yang berdekatan, makrofag, atau dikeluarkan dari lumen. (Lawler, 1992). Berbeda dengan nekrosis, pada apoptosis tidak akan terjadi reaksi inflamasi karena tidak ada isi sel yang lepas ke jaringan yang dapat merangsang reaksi inflamasi (Cotran, 1999). Perbedaan antara apoptosis dan nekrosis secara garis besar disajikan pada tabel 2.1 dan gambar 2.2 berikut ini.

Tabel 2.1 Perbedaan apoptosis dan nekrosis (Underwood, 1999).

Bentuk	Apoptosis	Nekrosis
Induksi	Rangsang fisiologis/ patologis	Cidera patologis
Perluasan	Sel tunggal	Kelompok sel
Peristiwa biokemikal	Fragmentasi bergantung energi dari DNA oleh endonuklease endogen Lisosom utuh	Ketidak mampuan atau berhentinya keseimbangan ion. Lisosom sobek
Membran sel	Tetap	Lisis
Morfologi	Sel <i>shrinkage</i> , kondensasi kromatin, <i>apoptotic bodies</i>	Sel bengkak, lisis
Respon radang	Tidak ada	Ada
Nasib sel	Fagosit sel didekatnya	Fagosit oleh neutrofil polimorf dan makrofag



Gambar 2.2 Rangkaian perubahan ultrastruktur pada sel nekrosis dan apoptosis. (Sumber : Cotran dkk., 1999)

a) Peran *p53* dalam apoptosis

Gen *p53* adalah gen penekan tumor (*tumor suppressor gen*); mempunyai berat molekul 53 kilodalton (kDA). Gen *p53* berlokasi pada lengan pendek kromosom 17 *band* 13 (kromosom 17 p13 dan berisi 11 exon. Gen *p53* yang normal atau tidak mengalami mutasi disebut '*wild type p53*' (*Wtp53*), sedangkan *p53* yang mengalami mutasi dikenal dengan '*mutant p53 protein*' (*Mtp53*) (Bristow, 1996).

Gen *p53* memproduksi protein *p53* (*p53*), yang mempunyai peran penting dalam regulasi proliferasi sel. Mutasi gen *p53* dapat menyebabkan pertumbuhan tumor (Orem, 1992). Protein *p53* yang tidak mengalami mutasi (*Wtp53*) berlokasi di nukleu dan mempunyai waktu paruh 20 menit, sedangkan *p53* yang mengalami mutasi (*Mtp53*)

mempunyai waktu paruh lebih panjang, yaitu beberapa jam (Cotran, 1999).

Protein *p53* terdiri dari 393 asam amino. Protein *p53* memiliki 3 domain atau daerah fungsi yang berbeda berdasarkan urutan asam amino yang menyusun. Domain ke-1 disebut *N-terminal transactivation domain*; berlokasi paling ujung, mempunyai urutan asam amino 1 – 75, bermuatan sangat asam dan berperan mengaktifkan proses transkripsi. Domain ke-2 disebut *DNA binding domain*, berlokasi di tengah, mempunyai urutan asam amino 102 – 292 dan berfungsi untuk mengenal dan mengikat materi DNA lain. Domain ke-3 disebut *carboxy-terminal domain*, merupakan daerah ujung karboksi, mempunyai urutan asam amino 323-393 dan merupakan domain yang aktif (Levine, 1995; Bristow, 1996).

Protein *p53* mempunyai fungsi mengaktifasi transkripsi sejumlah gen yang mengandung *situs p53 binding spesific*, menghentikan pertumbuhan sel dan mendorong sel untuk melakukan apoptosis (Orem, 1992; Cotran, 1999). Bila terjadi kerusakan DNA, maka *p53* teraktivasi akan menginduksi transkripsi protein 21 (*p21*) yang menyebabkan siklus sel berhenti pada tahap G1 dan tidak akan masuk ke tahap S. Penghentian siklus sel ini akan memberikan kesempatan sel untuk memperbaiki kerusakan yang terjadi dan dapat mengurangi kemungkinan terjadi mutasi selama replikasi DNA (Bristow, 1996; Cotran, 1999).

Protein *p53* selain menginduksi transkripsi protein *p21*, juga akan menginduksi transkripsi protein *growth-arrest DNA damage 45* (GADD-45), yaitu suatu protein yang bertanggung jawab terhadap perbaikan DNA. GADD-45 juga membantu perlambatan G1 dengan mekanisme yang belum jelas. Apabila kerusakan DNA telah diperbaiki, *p53* akan mengaktivasi gen *mouse double minute-2* (MDM2). MDM2 adalah gen yang mengatur regulasi *p53* dengan cara mengikat *p53* sehingga menjadi bentuk yang inaktif; dengan demikian proliferasi sel akan berlangsung kembali (Chen, 1991; Cotran, 1999). Apabila selama siklus sel berhenti, kerusakan DNA tidak dapat diperbaiki, maka *WTp53* akan mengisyaratkan bahwa sel harus diapoptosis, yaitu dengan mengaktivasi gen pro-apoptosis dari kelompok gen *Bcl-2* terutama *Bax*. *Bax* yang teraktivasi selanjutnya akan mengaktivasi sistem *caspase* dan akan berakhir dengan apoptosis (Cotran, 1999; Reed, 2000; Nugrahaningsih, 2004).

b) Kelompok gen *Bcl-2*

Kelompok gen *Bcl-2* pada mamalia homolog dengan gen anti apoptosis *C elegans death-9* (*ced-9*) dan pro apoptosis *eg-1* pada *C. elegans*. Gen ini terletak pada bagian luar membran mitokondria, retikulum endoplasma dan membran nukleus. Kelompok gen *Bcl-2* sampai saat ini telah diketahui memiliki 20 anggota, sebagian bersifat

pro-apoptosis atau *death gens* dan sebagian yang lain bersifat anti-apoptosis atau *survival gens* (Mercola, 2001; Robens, 2001)

Protein *Bcl-2* yang dihasilkan gen *Bcl-2*, terdiri dari kelompok protein yang pro-apoptosis dan kelompok protein anti-apoptosis. Protein yang termasuk dalam kelompok pro apoptosis adalah *Bax*, *Bak*, *Bad*, *Bid*, *Bik* dan *Bcl-xs*; sedangkan yang termasuk kelompok protein anti apoptosis adalah *Bcl-2*, *Bcl-xl*, *mcl-1*, *Bfl-1*, *Ced 9* dan *Bcl-2-l-10* (Tauhid dan Indra, 2000; Renehan, 2001; Robens, 2001; Nugrahaningsih, 2004).

Ekspresi beberapa protein kelompok *Bcl-2* mempunyai arti secara klinis. Ekspresi *Bcl-2* yang tinggi didapatkan pada beberapa tumor padat. Kanker dengan *Bcl-2* positif mempunyai prognosis yang lebih baik dibanding *Bcl-2* negatif. Anti apoptosis lain yaitu *Bcl-xl* mempunyai ekspresi yang lemah pada sel kelenjar mamma normal, sedangkan ekspresi yang tinggi didapatkan pada sediaan sel kanker mamma. *Bax* yang merupakan gen penekan tumor mempunyai ekspresi tinggi pada sel kelenjar mamma yang normal dan karsinoma in situ; edangkan ekspresi *Bax* yang rendah didapatkan pada kanker mamma yang metastase (Nugrahaningsih, 2004).

Bcl-2 menghambat apoptosis melalui dua cara, yaitu bereaksi langsung pada mitokondria untuk mencegah peningkatan permeabilitas mitokondria sehingga dapat mencegah *cytochrom-c* terlepas dan berefek sebagai mediator akibat interaksi dengan protein yang lain. Kelompok

protein pro-apoptosis akan bertindak meningkatkan permeabilitas membran mitokondria untuk menghasilkan pelepasan sitokrom C. Sensitifitas sel terhadap apoptosis tergantung pada keseimbangan atau perbandingan relatif antara protein pro apoptosis dan anti apoptosis. Jika protein yang dominan adalah protein pro-apoptosis maka sel akan lebih sensitif terhadap apoptosis, dan jika protein yang dominan adalah protein anti-apoptosis maka sel akan kurang sensitif terhadap apoptosis (Green dan Reed, 1998; Reed, 2000; Nugrahaningsih, 2004).

2.2.3 Efek biologis radiasi ionisasi pada tingkat jaringan dan organ

Kerusakan sel akibat radiasi dapat menghasilkan kerusakan jaringan dan organ jika dosis radiasi yang diberikan sangat tinggi. Kerusakan jaringan dan organ terjadi melalui mekanisme atropi atau pengurangan dalam ukuran (Bushong, 1998). Kerusakan jaringan dan organ akibat radiasi ionisasi tergantung pada jumlah atau dosis radiasi, sensitifitas jaringan atau daerah tubuh yang diradiasi dan luas daerah radiasi (Edwards, 1990).

2.2.4 Efek biologis radiasi ionisasi pada tingkat seluruh tubuh

Respon manusia terhadap radiasi dibedakan dalam efek segera atau efek jangka pendek (*early effects*) dan efek terlambat atau efek jangka panjang (*late effects*). Efek segera terjadi dalam beberapa menit, jam, atau minggu sejak radiasi diberikan; sedangkan efek jangka panjang terjadi setelah beberapa bulan atau beberapa tahun setelah radiasi diberikan. Efek jangka pendek radiasi terjadi pada

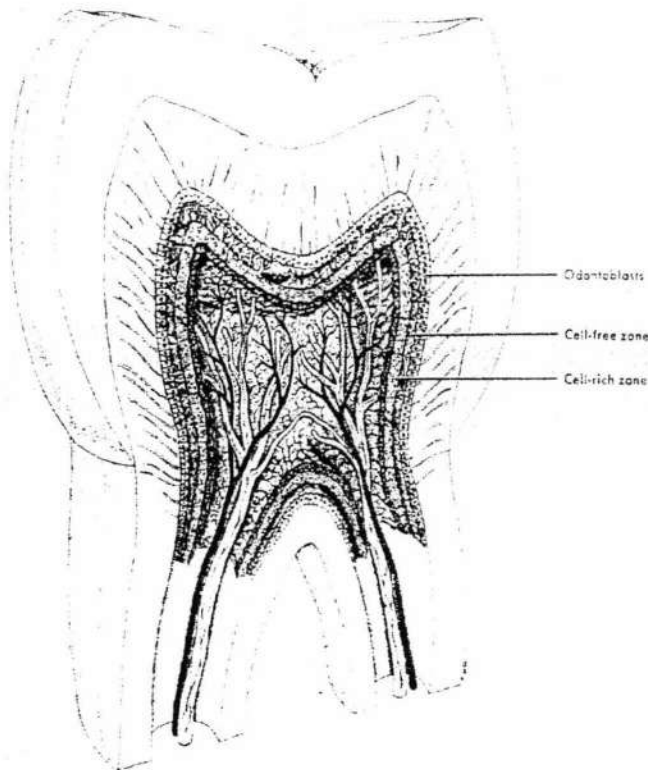
dosis radiasi yang tinggi diatas 25 rad, sedangkan efek jangka panjang radiasi terjadi pada dosis radiasi yang rendah (kurang dari 25 rad) dan kronis selama bertahun-tahun (Edwards, 1990; Bushong, 1998).

2.3 Pulpa Gigi

Jaringan pulpa gigi merupakan jaringan lunak yang ada di dalam gigi. Jaringan pulpa terdiri dari jaringan ikat, unsur sel, bahan interseluler, cairan jaringan, pembuluh darah, pembuluh saraf dan pembuluh limfa. Bahan interseluler terdiri dari bahan dasar (*ground substance*) dan *fibrous substance* (Melfi, 1988).

Pada bagian tengah atau pusat jaringan pulpa dari mahkota sampai akar gigi sebagian besar terdiri dari pembuluh darah, saraf dan limfa. Pada daerah tepi pulpa dibatasi oleh *odontogenic region* yang terdiri dari 3 lapisan sel, yaitu : 1) Lapisan odontoblas, terdiri dari sel odontoblas yang membentuk satu deretan sel; 2) Lapisan *free cell* atau *weil's zone*, yaitu lapisan yang sedikit mengandung unsur sel; dan 3) Lapisan *rich cell*, yaitu lapisan yang mengandung banyak sel terutama fibroblas dan *undifferentiated mesenchymal cell* (Bhaskar, 1990). Bagian-bagian dari pulpa tersebut lebih jelas terlihat pada gambar 2.3 berikut ini.

Pada gigi yang masih muda, jaringan pulpa banyak mengandung unsur sel, sedangkan pada gigi yang sudah tua atau matur unsur sel akan berkurang dan unsur fibrous akan meningkat. Unsur sel jaringan pulpa terdiri dari odontoblas, fibroblas, *undifferentiated mesenchymal cell*. Sel yang lain adalah sel darah, sel saraf dan sel pertahanan seperti histiosit, makrofag, *mast cell*, sel plasma dan eosinofil granulosit (Bhaskar, 1990; van Rensburg, 1995).



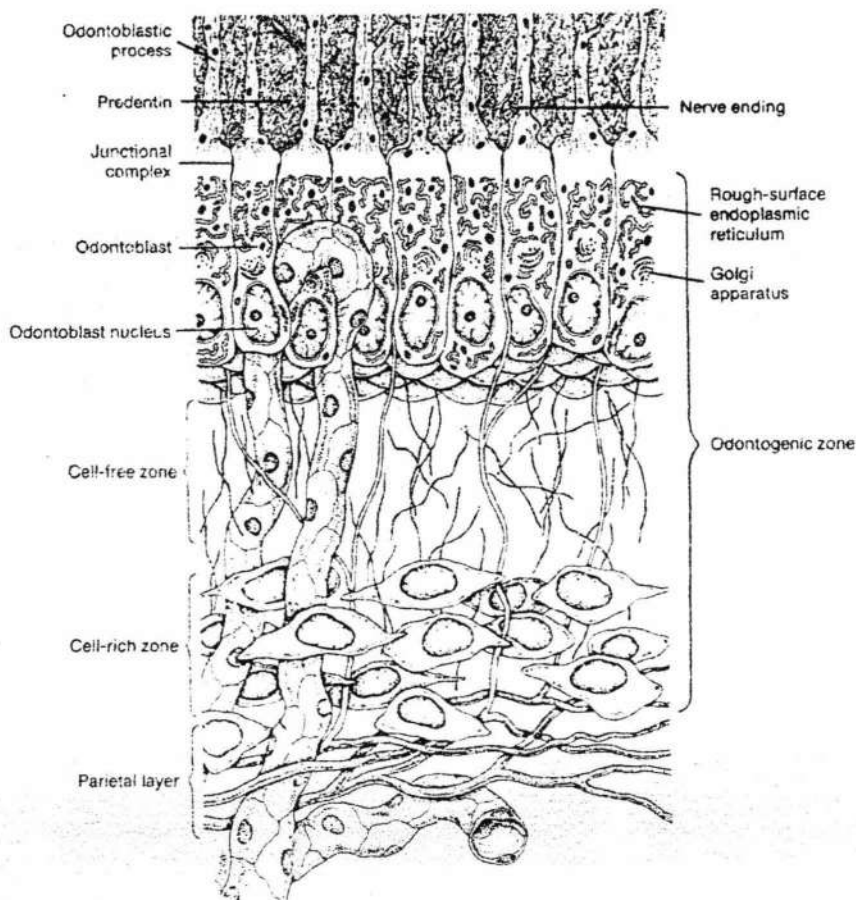
Gambar 2.3 Diagram rongga pulpa gigi bagian koronal. Lapisan odontoblas, *cell-free zone* dan *cell-rich zone* terdapat pada bagian tepi pulpa. (Sumber : Bhaskar, 1990)

Jaringan pulpa mempunyai fungsi sebagai berikut (van Rensburg, 1995):

1. Fungsi induktif dan formatif, yaitu pembentukan email (pada masa perkembangan gigi) dan dentin (berlangsung seumur hidup).
2. Fungsi reparatif, yaitu pembentukan dentin sekunder sebagai respons pertahanan terhadap jejas dari luar seperti bakteri, mekanik, kemis dan termis.
3. Fungsi defensif atau pertahanan
4. Fungsi nutritif
5. Fungsi sensoris

2.4 Sel Fibroblas Jaringan Pulpa

Fibroblas adalah jenis sel yang paling banyak dalam jaringan pulpa. Fibroblas terdapat pada bagian kaya sel (*cell-rich zone*) dari zona odontogenik yang terdapat pada bagian tepi jaringan pulpa di bawah lapisan odontoblas dan *cell-free zone*. Fibroblas banyak terdapat pada daerah mahkota gigi (Bhaskar, 1990). Zona odontogenik jaringan pulpa disajikan pada gambar 2.4 berikut ini.



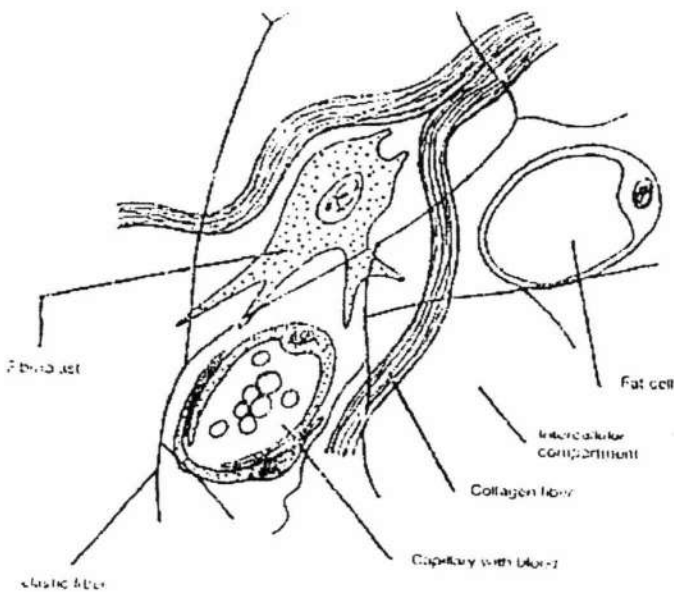
Gambar 2.4 Diagram zona odontogenik pulpa. Fibroblas terdapat pada *cell-rich zone*.
(Sumber : Bhaskar, 1990)

Fungsi utama fibroblas dalam jaringan pulpa adalah membentuk dan mempertahankan matriks jaringan pulpa, yaitu dengan membentuk *ground substance* dan serat kolagen. Pembentukan *ground substance* dan serat kolagen berlangsung sepanjang kehidupan pulpa. Fibroblas dapat berubah menjadi odontoblas apabila dibutuhkan, misal akibat adanya jejas dari luar. Fibroblas juga mempunyai kemampuan untuk merusak dan mendegradasi serat kolagen; selain itu pada kondisi tertentu berpartisipasi dalam remodeling pulpa gigi (Roth and Calmes, 1981; Bhaskar, 1990).

Ground substance atau bahan dasar merupakan komponen ekstra seluler atau inter seluler yang berupa *jelly-like material* yang dibutuhkan oleh semua elemen seluler dan fibrous dalam jaringan pulpa. Elemen ekstraseluler yang lain adalah *fibrous substance* (Melfi, 1988). Komponen utama dari *ground substance* ini adalah glikosaminoglikan, glikoprotein, glikolipid dan air. *Ground substance* berperan dalam mendukung sel dan beraksi sebagai medium dalam transpor nutrien dan proses metabolisme. Gangguan pada proses transpor ini dapat terjadi karena umur atau penyakit yang dapat mengakibatkan perubahan metabolik, pengurangan fungsi sel dan menghasilkan deposisi mineral yang tidak teratur (Roth dan Calmes, 1981).

Fibroblas merupakan sel yang besar, mempunyai bentuk *stelat* atau seperti bintang dan mempunyai cabang atau tonjolan sel. Inti sel berbentuk oval atau memanjang dan diliputi membran inti halus dengan satu atau dua anak inti jelas. Tonjolan sel tersebut saling kontak dan dihubungkan oleh *intercelluler junctions* dengan tonjolan sel yang lain sehingga menyerupai jala. Pada kebanyakan sajian

histologi, batas sel tidak nyata dan untuk mengenali dapat melihat ciri inti sel. Dengan mikroskop cahaya, sitoplasma tampak terang dan homogen, namun dengan mikroskop elektron fibroblas tampak mempunyai banyak *rough endoplasmic reticulum* (RER), mitokondria, mikrotubuli dan organel lain. Hal ini menunjukkan bahwa fibroblas adalah sel yang aktif (Bhaskar, 1990; Leeson, 1990; van Rensburg, 1995). Gambaran sel fibroblas lebih jelas terlihat pada gambar 2.5 berikut ini.



Gambar 2.5 Sel fibroblas (Sumber: van Rensburg, 1995).

Terdapat beberapa penampakan sel fibroblas tergantung pada umur jaringan pulpa. Pada pulpa muda yang masih aktif dalam sintesis protein, fibroblas tampak bercabang, sitoplasma relatif homogen dan bersifat basofilik karena kandungan *rough endoplasmic reticulum* (RER) yang tinggi. Pada fibroblas muda juga tampak mitokondria yang berupa batang-batang langsing dan

paling banyak terdapat dekat inti. Fibroblas yang sudah dewasa atau matur relatif kurang aktif, bentuknya tampak bulat atau *spindle* dengan cabang tonjolan yang pendek, sitoplasma bersifat basofil lemah karena kandungan RER dan organel lain yang sedikit. Fibroblas dewasa dan relatif tidak aktif ini disebut fibrosit (Bhaskar, 1990; Leeson, 1990).

Sesuai dengan perkembangan gigi, jumlah elemen seluler dalam jaringan pulpa akan berkurang dan jumlah serat kolagen akan meningkat. Pada embrionik dan pulpa yang imatur, jumlah elemen seluler sangat dominan tetapi pada pulpa yang matur komponen serat yang dominan (Bhaskar, 1990).

Fibroblas dipandang sebagai sel tetap pada jaringan ikat, tetapi mereka tetap mampu tumbuh dan beregenerasi seumur hidup. Apabila ada rangsangan mereka dapat melakukan gerakan merambat secara perlahan. Peningkatan fibroblas pada daerah luka mungkin disebabkan kenyataan bahwa fibroblas sendiri dapat bertindak sebagai sel induk (Leeson, 1990).

2.4 Rat Sebagai Binatang Coba untuk Penelitian Laboratorium

Rodent atau binatang mengerat adalah jenis binatang yang paling sering digunakan, yaitu sekitar 80% dari semua binatang vertebrata untuk penelitian yang berjumlah sekitar 1800 spesies (van Zutphen, 1993). Binatang yang sering digunakan dalam penelitian yang berhubungan dengan radiasi adalah *Rat* dan *Mouse*; binatang yang lain adalah *Hamster*, *Rabbit*, *Guinine Pig*, *Swine*, *Cat*, *Dog* dan *Monkey* (Kimeldorf, 1963).

Rat yang digunakan untuk penelitian laboratorium adalah keturunan dari *brown rat (rattus norvegicus)*. Strain *rat* pertama untuk penelitian biomedis dikembangkan pada Wistar Instituts di Philadelphia. *Rat* adalah binatang vertebrata yang paling umum digunakan setelah *mouse*; terutama digunakan untuk penelitian *medicine*, pangan, *behaviour* dan toksitas (van Zutphen, 1993).

Lama hidup *rat* adalah 3-4 tahun. Umur untuk disapih sekitar 21 hari, umur dewasa adalah 40-60 hari dan umur dikawinkan untuk jantan dan betina adalah 10 minggu. Berat badan (BB) Lahir 5-6 gram, BB dewasa *rat* jantan adalah 300-500 gram dan betina 250-300 gram. Kecepatan tumbuh *rat* sekitar 5 gram/hari. *Rat* mempunyai aktivitas nokturnal atau pada malam hari (Van Zutphen, 1993; Smith dan Mangkoewidjojo, 1988).

Gigi *rat* termasuk *monophyodont* artinya gigi tersebut hanya tumbuh satu kali selama kehidupannya, yang berarti tidak ada pergantian gigi. *Rat* mempunyai formula gigi $2(1003/1003)$, yang berarti pada setiap setengah rahang terdapat satu gigi insisif dan tiga gigi molar. Pada rahang bawah, gigi insisif memanjang melebihi atau melawati gigi molar (van Zutphen, 1993; Farris dan Griffith, 1971).

Gigi insisif tumbuh, berkalsifikasi dan bererupsi terus menerus sepanjang kehidupan *rat*, sehingga tampak sebagai satu siklus kehidupan perkembangan gigi mulai dari permulaan sampai maturiti. Gigi insisifus berbentuk seperti segmen dari gunting atau alat pemotong yang menyerupai gunting. Ukuran labio-palatal gigi insisifus atas lebih lebar dengan sudut lengkung yang lebih kecil, sedangkan ukuran labio-lingualnya gigi insisifus bawah lebih sempit tetapi mempunyai sudut lengkung yang lebih besar. Gigi insisifus tidak mempunyai akar tetapi terdiri dari

korona yang sangat kuat. Terdapat atrisi pada tepi insisal akibat pemakaian yang terus menerus. Bagian labial dilapisi email, tetapi bagian lingual tidak dilapisi email melainkan sementum. Hal ini menyebabkan insisal edge gigi insisifus berbentuk seperti pahat, dikarenakan bagian lingual gigi relatif lebih lunak daripada bagian labial. Pada potongan melintang dentin berbentuk konus dan melebar ke arah medio-lateral (Farris dan Griffith, 1971).

BAB 3

KERANGKA KONSEPTUAL DAN HIPOTESIS PENELITIAN

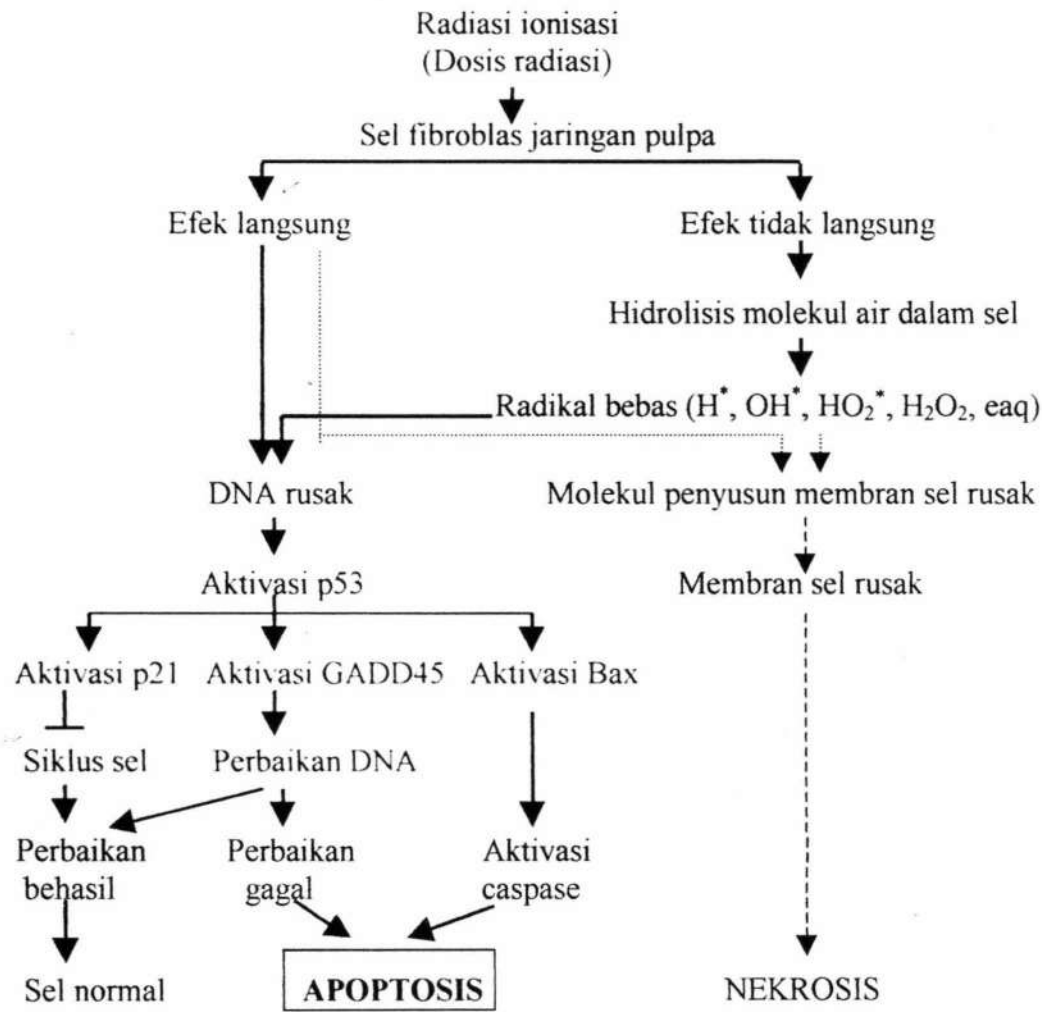
MILIE
PERPUSTAKAAN
UNIVERSITAS AIRLANGGA
SURABAYA

BAB 3

KERANGKA KONSEPTUAL DAN HIPOTESIS PENELITIAN

3.1 Kerangka Konseptual Penelitian

Penelitian ini dilakukan dengan mengacu pada kerangka konseptual berikut ini.



Keterangan :

———— = diteliti

- - - - - = tidak diteliti

Gambar 3.1 Bagan alur kerangka konseptual penelitian

3.2 Penjelasan Kerangka Konseptual

Radiasi ionisasi yang dipaparkan pada daerah kepala dan leher dapat menyebabkan efek biologis berupa kematian sel (apoptosis atau nekrosis) dalam jaringan pulpa. Salah satu faktor yang menentukan jenis kematian sel yang terjadi akibat radiasi (apakah apoptosis atau nekrosis) adalah besarnya dosis radiasi yang dipaparkan. Salah satu sel dalam jaringan pulpa yang terkena efek biologis radiasi adalah sel fibroblas. Efek biologis radiasi dapat terjadi melalui aksi langsung maupun aksi tidak langsung (Goaz dan White, 1982). Efek langsung radiasi ionisasi terutama terjadi pada DNA yang merupakan molekul terpenting dan paling peka di dalam sel, sehingga dapat terjadi kerusakan DNA sebelum terjadi kerusakan molekul atau struktur sub-sel yang lain. Kerusakan DNA juga dapat terjadi akibat efek tidak langsung radiasi ionisasi, yaitu oleh radikal bebas yang terbentuk akibat radiolisis molekul air, terutama yang paling berbahaya adalah radikal bebas hidroksil (OH^*).

Adanya DNA yang mengalami kerusakan, akan menstimulasi sel untuk mengaktifkan protein *p53*. Protein *p53* yang teraktivasi, selanjutnya akan menginduksi protein *p21* yang akan menyebabkan siklus sel berhenti untuk memberi kesempatan sel melakukan perbaikan DNA. *p53* yang teraktivasi juga akan menginduksi *GADD45*, yaitu suatu protein yang berperan dalam perbaikan DNA. Apabila perbaikan berhasil, maka sel akan normal kembali, tetapi apabila perbaikan mengalami kegagalan, maka *p53* akan mengaktivasi gen pro-apoptosis terutama *bax.bax* yang teraktivasi selanjutnya akan menginduksi pelepasan *cytochrom-c* dari mitokondria. *Cytochrom-c* yang terlepas selanjutnya akan

berikatan dengan *apaf-1* di sitosol yang kemudian akan mengaktifkan sistem *caspase* dan berakhir dengan apoptosis (Cotran, 1999).

Efek tidak langsung radiasi ionisasi juga dapat menyebabkan kerusakan molekul lain yang penting di dalam sel seperti protein, lipid dan karbohidrat. Lipid, protein dan karbohidrat merupakan molekul utama penyusun membran sel sehingga dapat terjadi kerusakan pada membran sel. Kerusakan membran sel akan menyebabkan air dan cairan yang lain dapat masuk dan terakumulasi di dalam sel sehingga sel akan pecah dan terjadi nekrosis (Edwards, 1990; Bushong, 1998; Cotran, 1999).

3.3 Hipotesis Penelitian

Berdasarkan teori pada uraian kaji putaka, maka dapat dirumuskan hipotesis penelitian sebagai berikut:

1. Terjadi peningkatan apoptosis sel fibroblas jaringan pulpa akibat paparan radiasi ionisasi dosis tunggal 100 rad.
2. Terjadi peningkatan apoptosis sel fibroblas jaringan pulpa akibat paparan radiasi ionisasi dosis tunggal 200 rad.
3. Terjadi peningkatan apoptosis sel fibroblas jaringan pulpa akibat paparan radiasi ionisasi dosis tunggal 400 rad.
4. Terdapat perbedaan peningkatan apoptosis sel fibroblas jaringan pulpa akibat paparan radiasi ionisasi diantara dosis radiasi tunggal 100 rad, 200 rad dan 400 rad.

BAB 4

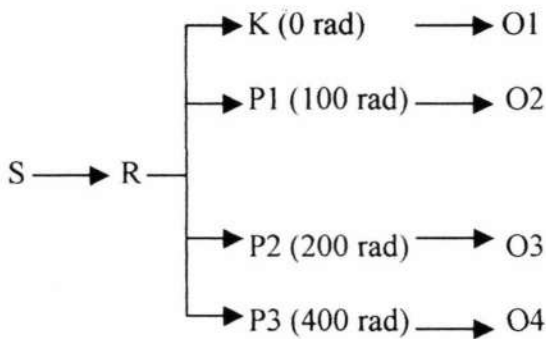
METODE PENELITIAN

BAB 4

METODE PENELITIAN

4.1 Jenis dan Rancangan Penelitian

Penelitian ini adalah penelitian eksperimental laboratorium dengan menggunakan rancangan penelitian *The Posttest-Only Control Group Design*. Rancangan ini dipilih karena populasi dianggap homogen sehingga tidak perlu dilakukan pengukuran awal (Zainudin, 2000). Sekema rancangan penelitian *The Posttest-Only Control Group Design* terlihat pada gambar 4.1 berikut ini



Keterangan:

S = sampel

R = randomisasi

P = perlakuan

K = kontrol

O = observasi

Gambar 4.1 Skema rancangan penelitian

4.2 Populasi dan Sampel

Populasi penelitian adalah tikus putih (*rattus norvegicus*) strain wistar jantan. Kriteria sampel adalah binatang coba berumur 3-4 bulan, berat badan 125-150 gram dan sehat. Pengambilan sampel dilakukan secara acak dari sejumlah

binatang coba yang ada. Sampel penelitian dibagi menjadi 4 kelompok secara acak; 3 kelompok perlakuan dan 1 kelompok kontrol.

Besar sampel ditentukan dengan rumus sebagai berikut (Daniel, 1991):

$$n = \frac{Z^2 \cdot \sigma^2}{d^2}$$

Keterangan:

n = Besar sampel

Z = Nilai z pada tingkat kesalahan tertentu

σ = Standar deviasi penelitian sejenis sebelumnya

d = Kesalahan yang masih dapat ditoleransi

Berdasarkan perhitungan tersebut didapatkan $n = 4,29$. Pada penelitian ini akan digunakan $n = 6$, agar hasil penelitian lebih akurat. Hasil perhitungan besar sampel disajikan pada lampiran 1.

4.3 Variabel Penelitian

4.3.1 Klasifikasi variabel

1. Variabel bebas : Radiasi ionisasi dosis tunggal
2. Variabel tergantung: peningkatan apoptosis sel fibroblas jaringan pulpa
3. Variabel terkendali :
 1. Jenis binatang coba
 2. Jenis kelamin binatang coba
 3. Berat badan binatang coba
 4. Umur binatang coba
 5. Pemeliharaan binatang coba
 6. Pakan binatang coba

7. Minuman binatang coba
8. Jenis paparan
9. Metode pemaparan (Standar untuk radioterapi)
10. Jenis gigi
11. Cara pemeriksaan dan pengamatan

4.3.2 Definisi operasional variabel

1. Radiasi ionisasi dengan dosis tunggal adalah pancaran radiasi sinar gamma yang dihasilkan oleh alat *Cobalt-60 teletherapy* dan diberikan hanya sekali paparan dengan dosis masing-masing 100 rad (waktu 45 detik) , 200 rad (waktu 84 detik) dan 600 rad (waktu 168 detik) yang diarahkan pada bagian depan kepala binatang coba yang difiksasi dan tanpa anestesi.
2. Peningkatan apoptosis sel fibroblas jaringan pulpa adalah peningkatan jumlah sel fibroblas jaringan pulpa yang mengikat warna *Kit Apoptag Plus Peroksidase In Situ Apoptosis Detektion Kit* dan dinyatakan dalam persen.

4.4. Unit Analisis

Unit analisis pada penelitian ini adalah jaringan pulpa gigi insisif bawah tikus putih strain wistar jantan.

4.5 Bahan Penelitian

1. Binatang coba yaitu tikus wistar jantan
2. Obat patirasa (Eter dari Kimia Farma)
3. Pakan hewan coba
4. Air minum (PDAM)
5. *Formalin buffer* 10%
6. *S7101 Apoptag Plus Peroxidase In Situ Apoptosis Detection Kit* dari Intergen
7. *Proteinase K (Protein Digesting Enzym)*
8. *Deionized water* (dH₂O)
9. *Xylene*
10. PBS
11. Hidrogen Peroksida 30%
12. *Methyl green*
13. Etanol 70 – 100%
14. *Polylysin*
15. *Parafin histosec*
16. Kertas tissue
17. Film

4.6 Alat Penelitian

1. Unit radioterapi sinar gamma (*Cobalt-60 teletherapy unit* tipe XK-100 merk Phillip).
2. Kandang hewan coba (ukuran 40x 60x 15 cm) dari baki plastik yang ditutup kawat anyaman dan perlengkapannya.

3. Alat fiksasi hewan coba selama pemberian radiasi (pipa PVC dan kawat).
4. Seperangkat alat bedah sederhana (Pisau bedah, Raspatorium, Gunting, Pinset).
5. *Obyek glass dan cover glass*
6. *Mikropipet*
7. *Mikrowave oven*
8. *Water bath*
9. *Glass coplin jar*
10. Inkubator
11. Mikrotom
12. *Humidified chamber*
13. Alat foto mikrografi
14. Mikroskop cahaya
15. *Counter*

4.7 Lokasi Penelitian

Pemeliharaan binatang coba dilakukan di Fakultas Farmasi Universitas Airlangga Surabaya. Pemberian paparan radiasi dilakukan di Instalasi Radioterapi RSUD Dr. Soetomo Surabaya. Pemrosesan dan pewarnaan sediaan dilakukan di Laboratorium Patobiologi-GRAMIK Fakultas Kedokteran Universitas Airlangga Surabaya. Pengamatan dan penghitungan sel apoptosis dilakukan di Laboratorium Anatomi-Histologi Fakultas Kedokteran Universitas Airlangga Surabaya

4.8 Prosedur Pelaksanaan Penelitian, Pengambilan dan Pengumpulan Data

4.8.1 Persiapan binatang coba

pemilihan binatang coba dilakukan sesuai kriteria sampel dengan jumlah 10% lebih banyak dari yang diperlukan (untuk cadangan). Binatang coba yang telah terpilih selanjutnya dilakukan adaptasi selama satu minggu. Binatang coba dibagi menjadi empat kelompok, yaitu tiga kelompok perlakuan dan satu kelompok kontrol .

4.8.2 Pemberian paparan radiasi

Sebelum dilakukan pemaparan radiasi ionisasi, binatang coba difiksasi dengan cara dimasukkan dalam pipa PVC dengan diameter dan panjang yang sesuai. Pada bagian depan dan belakang pipa tersebut diberikan penghalang dari kawat melalui lubang yang dibuat pada pipa. Posisi kawat sedemikian rupa sehingga moncong kepala tikus dapat ke luar di bagian depan pipa. Bagian depan kepala binatang coba terutama daerah gigi insisif bawah diarahkan pada alat pemapar radiasi. Luas lapangan penyinaran yang digunakan adalah 20x20 cm yang diusahakan dapat mencakup enam ekor binatang coba.

Radiasi yang digunakan adalah radiasi sinar gamma dengan dosis tunggal; yaitu kelompok 1 = 0 rad atau tanpa radiasi (sebagai kelompok kontrol), kelompok 2 = 100 rad, kelompok 3 = 200 rad, dan kelompok 4 = 400 rad. Lama pemaparan radiasi diperoleh dengan menggunakan tabel yang telah ditera sesuai dengan umur sumber radiasi, selanjutnya dengan melihat luas lapangan penyinaran, kedalaman penyinaran serta dosis yang diberikan akan didapatkan

waktu yang diperlukan untuk pemaparan. Setelah pemaparan radiasi, seluruh binatang coba tersebut dikembalikan lagi ke kandang sampai waktu binatang coba tersebut dimatikan.

4.8.3 Pengambilan gigi dari binatang coba

Binatang coba dimatikan setelah 24 jam dari pemaparan radiasi dengan cara dianestesi terlebih dulu. Gigi insisif bawah diambil dengan cara dipotong beserta tulang rahang dan dimasukkan dalam larutan buffer formalin 10%.

4.8.4 Pembuatan sediaan rutin histopatologi (Leeson, 1991; Liben, 1992)

Teknik pembuatan sediaan rutin histopatologi selengkapnya disajikan pada lampiran 3.

4.8.5 Pewarnaan

Pewarnaan sediaan untuk pemeriksaan sel yang mengalami apoptosis dilakukan dengan metode *TUNEL Assay* menggunakan *S7101 Apoptag Plus Peroxidase In Situ Apoptosis Detection Kit*. Prosedur pewarnaan selengkapnya disajikan dalam lampiran 4.

4.8.6 Pengamatan dan penghitungan sel fibroblas jaringan pulpa yang mengalami apoptosis.

Pengamatan dan penghitungan sel apoptois dilakukan dibawah mikroskop cahaya dengan pembesaran 100 kali untuk melihat semua lapang pandang, kemudian ditingkatkan dengan pembesaran 400 kali. Daerah yang akan diamati

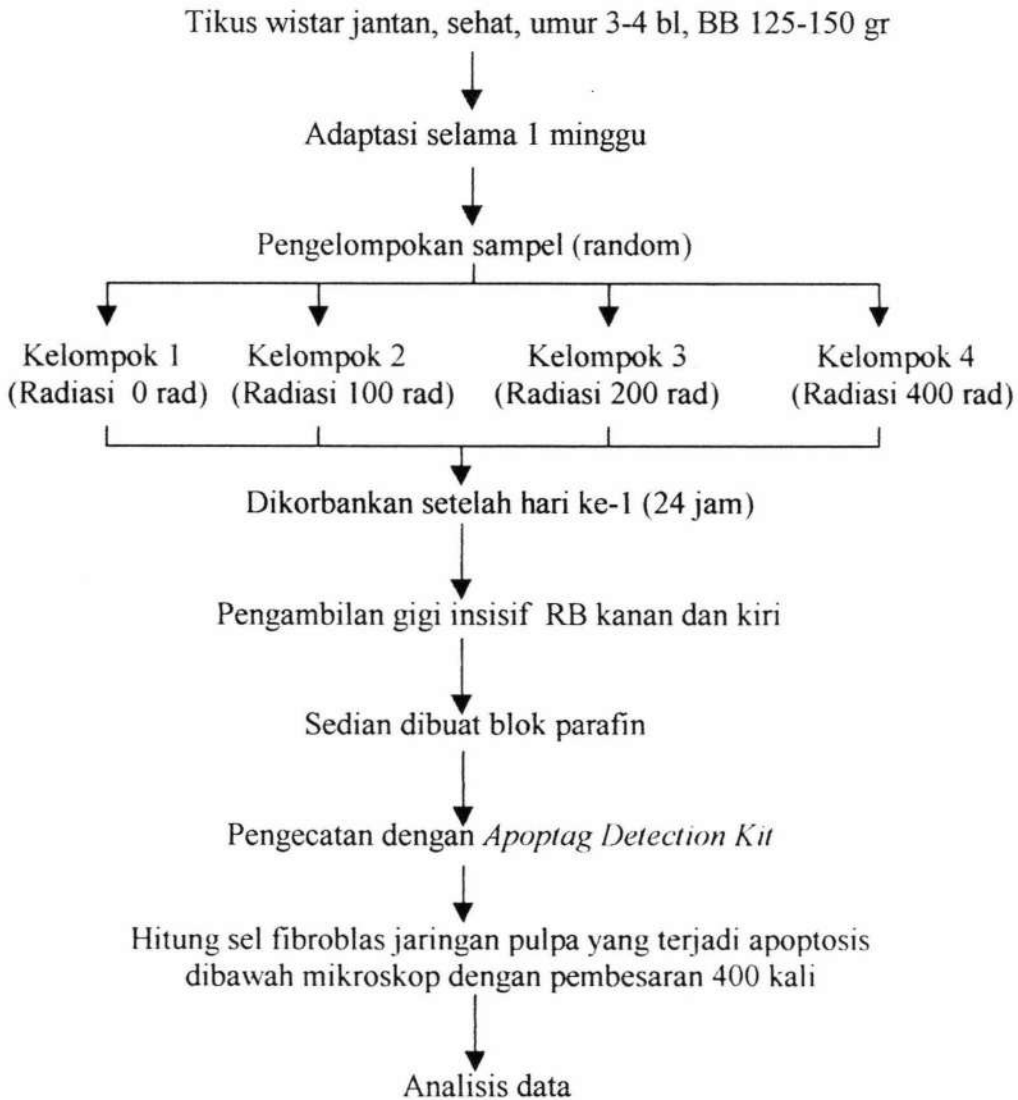
ditentukan terlebih dahulu, yaitu pada daerah sepertiga pulpa bagian tengah (1/3 *middle*) dibawah lapisan sel odontoblas dan lapisan *free-cell*. Penghitungan dilakukan pada dua area yang berbeda, yaitu bagian labial dan palatal, selanjutnya diambil rata-ratanya Penghitungan sel dilakukan dengan bantuan *grateculae*.. Identifikasi dan penghitungan dilakukan dengan teknik *blind test* oleh 3 orang pengamat.

4.9 Analisis Data

1. Untuk mengetahui perbedaan data hasil pengamatan dari tiga orang pengamat digunakan statistik Anova satu Arah. Bila tidak terdapat perbedaan, maka diambil salah satu data dari ketiga pengamat tersebut. Tingkat kesalahan (α) yang digunakan adalah 0,05. Hasil uji yang bermakna bila diperoleh harga $p < 0,05$ (Djarwanto, 2001; Furqon, 1997).
2. Untuk mengetahui perbedaan peningkatan apoptosis sel fibroblas jaringan pulpa akibat radiasi ionisasi diantara 4 kelompok digunakan analisis statistik Anova satu Arah. Bila terdapat perbedaan dilanjutkan dengan analisa *Least significant different* (LSD) untuk mengetahui perbedaan antar kelompok. Tingkat kesalahan (α) yang digunakan adalah 0,05. Hasil uji yang bermakna bila diperoleh harga $p < 0,05$ (Djarwanto, 2001; Furqon, 1997).

4.10 Kerangka Operasional Penelitian

Beberapa tahap pelaksanaan penelitian secara ringkas disajikan pada sekema kerangka operasional penelitian berikut ini.



Gambar 4.2 Bagan alur kerangka operasional penelitian

BAB 5

ANALISIS HASIL PENELITIAN

BAB 5

HASIL PENELITIAN

5.1 Data Hasil Penelitian

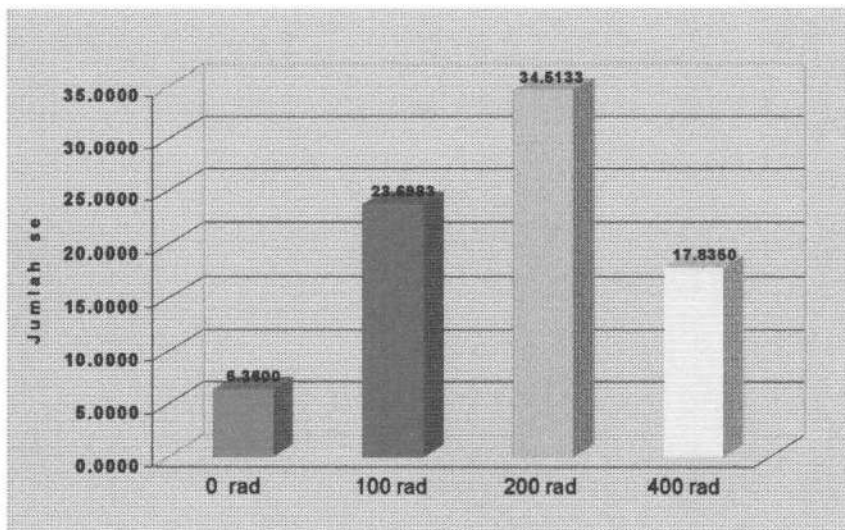
Pengamatan dan penghitungan sel fibroblas jaringan pulpa yang mengalami apoptosis dilakukan dibawah mikroskop cahaya dengan pembesaran 400 kali. Sel yang mengalami apoptosis akan berwarna coklat, sedangkan sel yang lain akan menyerap warna hijau sesuai dengan *counterstain* yang digunakan dalam penelitian ini yaitu *methyl green*.

Penghitungan sel fibroblas jaringan pulpa yang mengalami apoptosis dilakukan dengan mengamati dan menghitung jumlah sel yang mengalami apoptosis yang kemudian dibandingkan dengan jumlah seluruh sel fibroblas baik yang apoptosis maupun yang tidak dalam satu lapang pandang. Hasil penghitungan tersebut dinyatakan dalam persen. Untuk menghindari agar sel yang telah dihitung tidak terhitung kembali dan adanya sel yang tidak terhitung digunakan *grateculae* yang dipasang pada lensa okuler. Daerah yang diamati adalah sel fibroblas yang terdapat dibawah lapisan odontogenik (*odontogenic zone*) dan lapisan bebas sel (*free-cell zone*) pada bagian 1/3 koronal gigi sebanyak dua daerah lapang pandang; yaitu bagian labial dan bagian palatal.

Hasil penghitungan rerata persentase sel fibroblas jaringan pulpa yang mengalami apoptosis akibat radiasi ionisasi dosis tunggal 0, 100, 200 dan 400 rad disajikan dalam tabel 1 dan gambar 5.1. Keseluruhan data hasil pengamatan dan penghitungan jumlah sel fibroblas jaringan pulpa yang mengalami apoptosis disajikan dalam lampiran 5.

Tabel 5.1 Rerata persentasi sel fibroblas jaringan pulpa yang mengalami apoptosis akibat radiasi ionisasi dosis tunggal yang diamati setelah 24 jam dari radiasi.

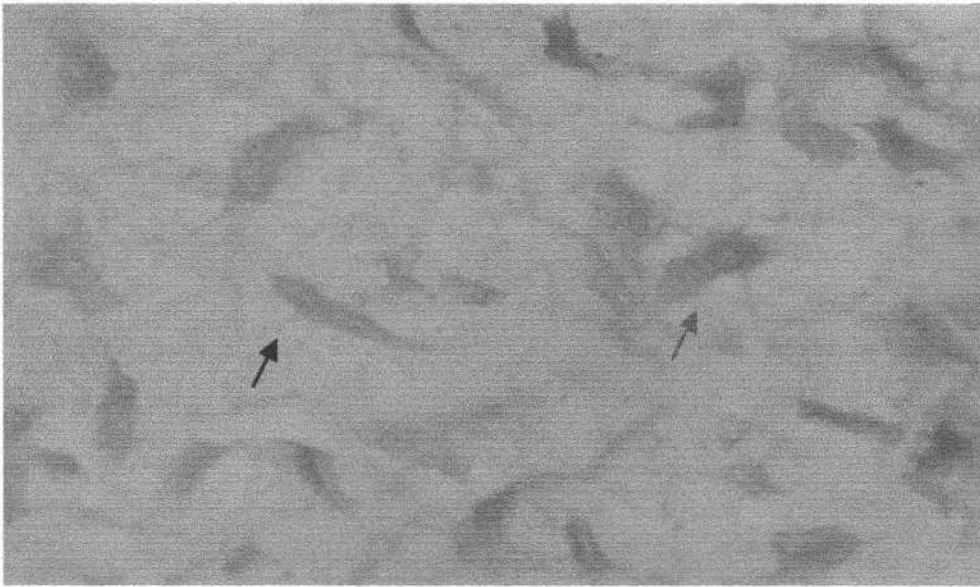
Dosis	Apoptosis		
	N	Mean	SD
Klp 1 (0 rad)	6	6,3600	1,1144
Klp 2 (100 rad)	6	23,6983	1,3967
Klp 3 (200 rad)	6	34,5133	1,4823
Klp 4 (400 rad)	6	17,8350	0,9339
Total	24	20,6017	10,4528



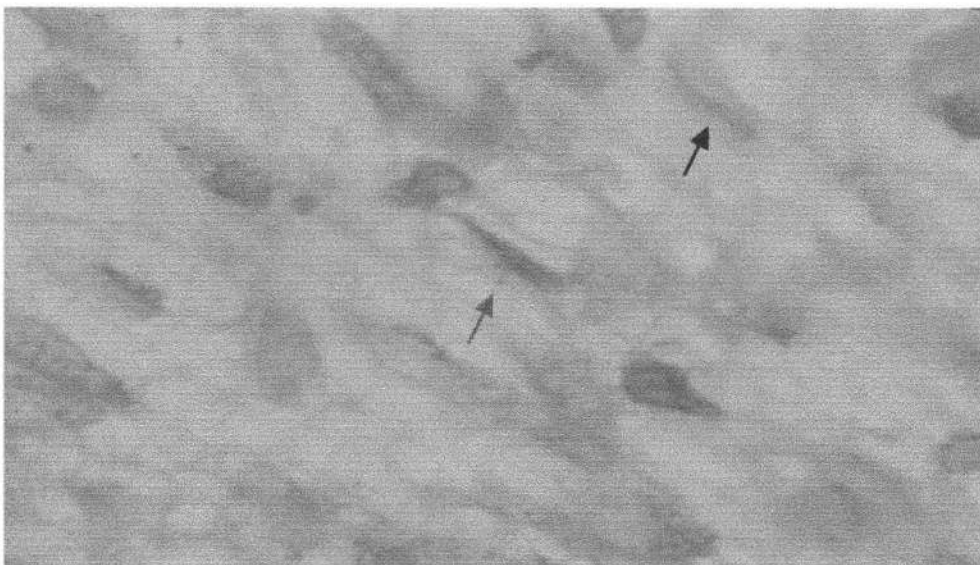
Gambar 5.1 Diagram batang rerata persentase sel fibroblas jaringan pulpa yang mengalami apoptosis akibat radiasi ionisasi dosis tunggal yang diamati setelah 24 dari radiasi

Dari tabel dan gambar tersebut terlihat bahwa sel fibroblas jaringan pulpa yang mengalami apoptosis paling banyak terjadi pada kelompok dengan paparan radiasi ionisasi dosis tunggal 200 rad, sedangkan pada kelompok dengan paparan radiasi ionisasi dosis tunggal 400 rad jumlah sel fibroblas yang mengalami apoptosis lebih rendah dari kelompok dengan paparan radiasi 200 rad dan 100 rad. Jumlah apoptosis sel fibroblas jaringan pulpa yang pada kelompok kontrol adalah yang paling rendah dibandingkan kelompok yang lain.

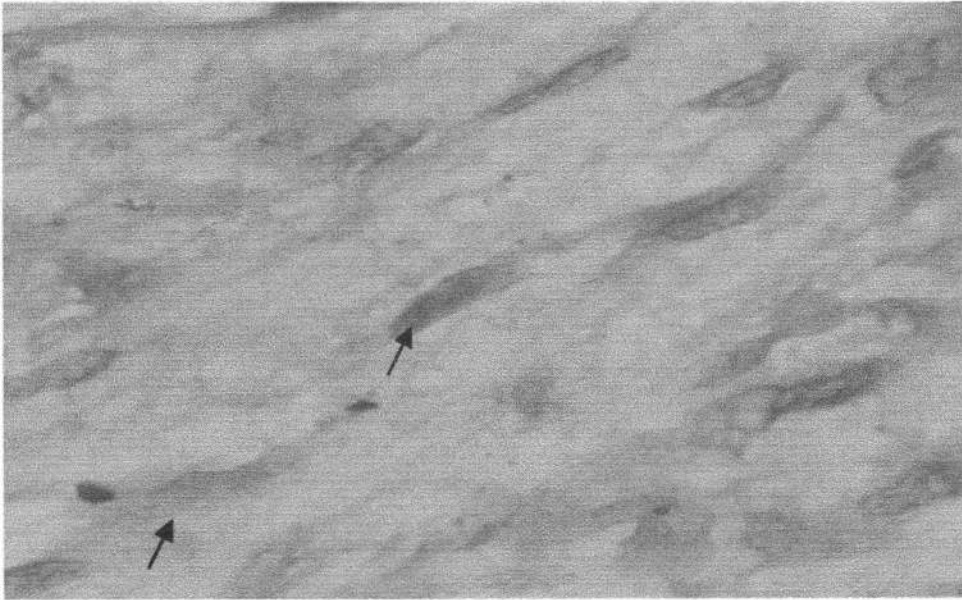
Hasil pewarnaan sel fibroblas jaringan pulpa yang mengalami apoptosis secara histokimia dengan metode TUNEL *assay* menggunakan *apoptag detection kit* disajikan pada gambar 5.2, 5.3, 5.4 dan 5.5 . Sel yang positif terjadi apoptosis berwarna coklat, sedangkan sel yang lain berwarna hijau sesuai *counterstain* yang digunakan yaitu *methyl green*. Sel yang dihitung adalah sel fibroblas yang mempunyai ciri-ciri berbentuk stelat atau lonjong, bercabang-cabang karena adanya *processus*, inti sel lonjong atau memanjang dengan 1 atau 2 anak inti dan tersebar diantara serat kolagen. Sel yang lain seperti sel mesenkimal, histiosit atau makrofag baik negatif maupun positif tidak diikutsertakan dalam penghitungan.



Gambar 5.2 Hasil pewarnaan dengan *S7101 Apoptag Plus Peroxidase In Situ Apoptosis Detection Kit* pada kelompok 1 atau kontrol (radiasi 0 rad). Keterangan: panah hitam = sel yang tidak mengalami apoptosis, panah biru = sel yang mengalami apoptosis (pembesaran 1000 kali).



Gambar 5.3 Hasil pewarnaan dengan *S7101 Apoptag Plus Peroxidase In Situ Apoptosis Detection Kit* pada kelompok 2 (radiasi dosis tunggal 100 rad). Keterangan: panah hitam = sel yang tidak mengalami apoptosis, panah biru = sel yang mengalami apoptosis (pembesaran 1000 kali).



Gambar 5.4 Hasil pewarnaan dengan *S7101 Apoptag Plus Peroxidase In Situ Apoptosis Detection Kit* pada kelompok 3 (radiasi dosis tunggal 200 rad). Keterangan: panah hitam = sel yang tidak mengalami apoptosis, panah biru = sel yang mengalami apoptosis (pembesaran 1000 kali).



Gambar 5.5 Hasil pewarnaan dengan *S7101 Apoptag Plus Peroxidase In Situ Apoptosis Detection Kit* pada kelompok 4 (radiasi dosis tunggal 400 rad). Keterangan: panah hitam = sel yang tidak mengalami apoptosis, panah biru = sel yang mengalami apoptosis (pembesaran 1000 kali).

5.2 Analisis Data Hasil Penelitian

Sebelum data hasil penelitian dilakukan analisis, data tersebut lebih dahulu dilakukan uji normalitas dan uji homogenitas. Kedua uji diperlukan agar hasil analisis statistik yang diperoleh nanti memiliki kebenaran yang dapat dipercaya kebenarannya serta agar interpretasi dan kesimpulan yang diambil tidak salah atau bias. Uji normalitas yang digunakan adalah uji *Kolmogorov-Smirnov*, sedangkan uji homogenitas yang digunakan adalah uji *Levene*. Keduanya menggunakan tingkat kesalahan (α) 0,05.

Hasil uji normalitas menunjukkan bahwa semua data dari ketiga pengamat pada semua kelompok penelitian mempunyai distribusi yang normal ($p > 0,05$). Demikian juga hasil uji homogenitas menunjukkan bahwa semua data dari ketiga pengamat pada semua kelompok penelitian adalah homogen ($p > 0,05$). Dengan demikian semua data hasil penelitian ini layak untuk dilakukan analisis. Hasil uji normalitas dan homogenitas disajikan pada lampiran 6.

Pengamatan dan penghitungan sel fibroblas jaringan pulpa yang mengalami apoptosis dilakukan oleh 3 orang pengamat, oleh karena itu uji statistik awal yang dilakukan bertujuan untuk mengetahui apakah terdapat perbedaan rerata persentase sel fibroblas jaringan pulpa yang mengalami apoptosis dari ketiga pengamat tersebut. Uji statistik yang digunakan untuk tujuan ini adalah *one-way anova* dan tingkat kesalahan (α) yang digunakan adalah 0,05. Hasil analisis dinyatakan berbeda bermakna bila $p \leq 0,05$ dan tidak berbeda bermakna bila $p \geq 0,05$.

Berdasarkan uji statistik *one-way anova* didapatkan bahwa persentase sel fibroblas jaringan pulpa yang mengalami apoptosis diantara ketiga orang pengamat tersebut pada semua kelompok penelitian tidak terdapat perbedaan yang bermakna ($p \geq 0,05$). Berdasarkan hasil uji statistik ini, maka untuk uji statistik berikutnya diputuskan akan digunakan data hasil penelitian dari salah satu pengamat, yaitu pengamat 1 (peneliti). Hasil uji statistik *one-way anova* untuk mengetahui perbedaan data hasil penelitian dari ketiga pengamat disajikan pada lampiran 6.

Uji statistik selanjutnya adalah untuk mengetahui apakah terdapat perbedaan persentase sel fibroblas jaringan pulpa yang mengalami apoptosis akibat paparan radiasi ionisasi diantara kelompok 1 atau kontrol (dosis 0 rad), kelompok 2 (dosis 100 rad), kelompok 3 (dosis 200 rad) dan kelompok 4 (dosis 400 rad). Seperti yang telah disebutkan diatas bahwa data hasil penelitian yang digunakan adalah data dari pengamat 1. Uji statistik yang digunakan untuk tujuan ini adalah *one-way anova* dengan tingkat kesalahan (α) 0,05.

Berdasarkan hasil uji statistik *one-way anova* didapatkan bahwa terdapat perbedaan yang bermakna persentase sel fibroblas jaringan pulpa yang mengalami apoptosis akibat paparan radiasi ionisasi diantara kelompok 1 atau kontrol, kelompok 2, kelompok 3 dan kelompok 4 ($p < 0,05$). Hasil uji statistik tersebut selengkapnya disajikan pada lampiran 7.

Uji statistik berikutnya yang dilakukan adalah uji LSD yang dimaksudkan untuk mengetahui perbedaan persentase sel fibroblas jaringan pulpa yang mengalami apoptosis akibat paparan radiasi ionisasi antar kelompok sampel.

Tingkat kesalahan (α) yang digunakan adalah 0,05. Hasil uji LSD terhadap semua kelompok yang dibandingkan menunjukkan bahwa terdapat perbedaan yang bermakna ($p < 0,05$), seperti terlihat pada tabel 5.2 dibawah ini. Hasil uji LSD selengkapnya disajikan pada lampiran 8.

Tabel 5.2 Analisis LSD antar kelompok sampel dengan tingkat kepercayaan 0,05.

Antar kelompok	Signifikansi
Kelompok kontrol dengan kelompok 1	0,001*
Kelompok kontrol dengan kelompok 2	0,001*
Kelompok kontrol dengan kelompok 3	0,001*
Kelompok 1 dengan kelompok 2	0,001*
Kelompok 1 dengan kelompok 3	0,001*
Kelompok 2 dengan kelompok 3	0,001*

Keterangan:

* = signifikan pada $\alpha = 0,05$

BAB 6

PEMBAHASAN

BAB 6

PEMBAHASAN

Penemuan sinar radiasi terutama radiasi ionisasi seperti sinar X dan sinar gamma telah memberikan sumbangan yang sangat besar terhadap perkembangan dan kemajuan di dunia kedokteran terutama dalam sub-bidang radiodiagnostik dan radioterapi. Selain di bidang kedokteran, terdapat kecendrungan juga terjadi peningkatan penggunaan radiasi ionisasi di bidang yang lain seperti dalam bidang industri. Selain memberikan manfaat yang besar bagi manusia, penggunaan radiasi ionisasi juga memberikan dampak yang merugikan pada manusia. Radiasi terutama radiasi ionisasi adalah salah satu agen yang kuat dalam menimbulkan kerusakan bahkan kematian terhadap sel, jaringan atau organ; sementara itu teknologi yang ada sampai saat ini belum dapat melindungi tubuh secara penuh dari efek samping radiasi ionisasi tersebut. Penelitian ini dilakukan dengan bertitik tolak dari adanya kenyataan bahwa terdapat efek samping penggunaan radiasi ionisasi dalam terapi berbagai jenis tumor di sekitar rongga mulut yang sampai saat ini belum dapat ditangani dengan baik. Radiasi ionisasi yang digunakan dalam penelitian ini adalah radiasi sinar γ yang biasa digunakan untuk radioterapi.

Unit radioterapi yang digunakan dalam penelitian ini mempunyai luas lapangan radiasi antara 10 x 10 cm sampai dengan 30 x 30 cm. Namun pada penelitian ini digunakan luas lapangan radiasi 25 x 25 cm; yang dimaksudkan agar keseluruhan bagian kepala dari 6 binatang coba dapat dipastikan menerima



paparan radiasi dalam sekali paparan. Hal ini dimungkinkan karena ke-6 binatang coba tersebut diatur sedemikian rupa dengan posisi telentang dua baris dengan kepala binatang coba terpusat pada tengah-tengah lapangan radiasi.

Dosis radiasi yang digunakan dalam penelitian ini adalah 0 rad sebagai kontrol, 100, 200 dan 400 rad. Penggunaan dosis 200 rad karena dosis ini merupakan dosis fraksinasi yang biasa digunakan dalam radioterapi. Dosis fraksinasi 200 rad kemudian diturunkan setengahnya yaitu 100 rad dan dinaikkan 2 kali yaitu 400 untuk digunakan juga dalam penelitian ini. Penggunaan dosis radiasi 100 rad ini juga berdasarkan pertimbangan bahwa pada dosis ini sudah cukup untuk menyebabkan kematian sel (Bushong, 1998), sedangkan dosis radiasi 400 rad masih dibawah dosis letal (LD 50/30) tikus *wistar* yang digunakan sebagai binatang coba dalam penelitian ini, yaitu 750 rad (Goaz dan White, 1987).

Waktu pemeriksaan adalah 24 jam setelah radiasi diberikan. Waktu ini diambil dengan pertimbangan bahwa dalam terapi radiasi dengan dosis fraksinasi, pemberian paparan radiasi diulang setiap 24 jam. Berdasarkan beberapa penelitian yang pernah dilakukan, kerusakan sel akibat radiasi sudah terjadi beberapa jam setelah radiasi diberikan. Berdasarkan penelitian yang dilakukan oleh Pratama (1994) pada sel odontoblas, Sulistiyani (2002) pada sel asinar kelenjar parotis, serta Ratridewi (2001) pada sel spermatogenia didapatkan bahwa perubahan morfologi inti sel odontoblas, apoptosis sel asinar kelenjar parotis dan apoptois el spermatogenia sudah dapat diamati pada 24 jam setelah radiasi diberikan.

Penelitian ini menggunakan rancangan peneltian eksperimental *The Postest-Only Control Group Design*. Rancangan penelitian ini dipilih dengan

pertimbangan bahwa tiap unit populasi mempunyai karakteristik yang sama sehingga pengukuran awal tidak perlu dilakukan. Selain itu secara teknis pada penelitian ini pengukuran awal tidak mungkin dilakukan karena akan merusak sampel. Penelitian dilakukan secara *invivo* pada binatang coba tikus jantan strain *wistar* karena perlakuan dan pemeriksaan dilakukan dengan merusak unit sampel sehingga tidak mungkin dikerjakan pada manusia.

Pada penelitian ini apoptosis sel fibroblas jaringan pulpa dideteksi dengan metode *Terminal Deoxyuridine Nucleotide End Labelling Assay (TUNEL Assay)* menggunakan *S7101 apoptag Plus Peroxidase In Situ Apoptosis Detection Kit*. Dasar teknologi *apoptag* ini adalah mendeteksi rantai DNA yang putus baik rantai tunggal maupun rantai ganda yang berhubungan dengan apoptosis secara enzimatis, yaitu dengan cara memberikan label pada ujung bebas 3'-OH yang banyak ditemukan pada sel yang mengalami apoptosis. Ujung DNA (ujung 3'-OH) yang terbentuk dari fragmentasi DNA ini banyak terdapat pada inti sel yang mengalami apoptosis maupun *apoptotic bodies*. Fragmen DNA tersebut akan dilabel dengan *digoxigenin-nucleotide* yang kemudian akan diikat oleh antibodi *anti-digoxigenin* dan selanjutnya akan dikonjugasikan dengan molekul *peroxidase*. Kemudian dengan menambahkan substrat kromogenin, pada sel yang mengandung ujung 3'-OH akan berwarna coklat, sedangkan sel yang tidak mengandung ujung 3'-OH akan berwarna hijau sesuai dengan *counterstain* yang digunakan, yaitu *methylgreen* (Intergen Company, 2001).

Teknik ini adalah sangat sensitif karena dapat mendeteksi tahap awal proses apoptosis yaitu pada saat kondensasi kromatin dan kerusakan rantai DNA masih sedikit serta belum terjadi perubahan morfologis pada inti sel. Teknik ini

juga dapat membedakan antara sel yang terjadi nekrosis dengan sel apoptosis karena teknik ini hanya mendeteksi kerusakan DNA yang berhubungan dengan apoptosis saja, yaitu adanya fragmen DNA dengan ujung 3'-OH. Pada nekrosis juga terjadi kerusakan DNA dan mungkin juga terdapat fragmen DNA dengan ujung 3'-OH, tetapi tidak sebanyak yang terjadi pada sel yang mengalami apoptosis sehingga pada pengecatan akan tampak sangat terang (Intergen Company, 2001).

Sel yang mengalami apoptosis sangat sulit dilihat menggunakan pengecatan biasa dan harus dengan pengecatan yang spesifik terhadap apoptosis. Hal ini disebabkan proses apoptosis berlangsung cukup cepat dan sel akan segera difagosit oleh sel sehat yang berdekatan sebelum mulai tampak perubahan morfologis yang secara histologis dapat diamati. Apoptosis biasanya juga hanya terjadi pada sel tunggal atau kelompok sel saja. Pada proses apoptosis juga tidak ada substansi intraseluler yang keluar ke jaringan sehingga tidak ada reaksi jaringan yang dapat diamati seperti reaksi inflamasi. (Cotran, 1999; Kerr dan Harmon, 1999).

Seperti yang telah disebutkan sebelumnya bahwa kematian sel akibat radiasi ionisasi dapat terjadi dalam dua bentuk, yaitu nekrosis dan apoptosis. Pada penelitian ini hanya diamati salah satu bentuk kematian sel saja yaitu apoptosis. Penelitian yang telah dilakukan berhasil membuktikan peningkatan persentase apoptosis sel fibroblas jaringan pulpa akibat paparan radiasi ionisasi, baik pada dosis 100 rad, 200 rad dan 400 rad. Hal ini membuktikan kebenaran dari teori bahwa radiasi ionisasi adalah agen yang kuat dalam menimbulkan kerusakan bahkan kematian sel (Cotran, 1999). Dengan demikian hipotesis 1, 2 dan 3 pada

penelitian ini diterima. Berdasarkan analisa statistik menggunakan *one-way anova* dengan tingkat kesalahan (α) 0,05 diperoleh adanya perbedaan yang bermakna persentase sel fibroblas jaringan pulpa yang mengalami apoptosis diantara kelompok paparan radiasi 0, 100, 200 dan 400 rad. Dengan demikian hipotesis ke-4 pada penelitian ini juga diterima.

Apoptosis pada sel yang mendapatkan paparan radiasi ionisasi terjadi karena energi foton dari sinar radiasi merusak molekul DNA. Kerusakan tersebut dapat terjadi baik melalui efek langsung maupun efek tidak langsung, yaitu oleh radikal bebas hasil dari radiolisis molekul air dalam sel; terutama adalah oleh radikal bebas hidroksil (OH^*) (Goas dan White, 1982; Bushong, 1998). Persentase molekul air dalam sel tubuh mencapai 80% berat (Edwards, 1990; Bushong, 1998), sehingga diperkirakan apoptosis pada penelitian ini sebagian besar terjadi melalui efek tidak langsung atau oleh radikal bebas. Pada sel yang mendapat paparan radiasi, molekul DNA akan menjadi target utama sehingga akan mengalami kerusakan yang paling banyak. Hal ini karena molekul DNA merupakan struktur sub-sel yang paling peka terhadap radiasi dibandingkan struktur sub-sel yang lain (Bushong, 1998). Seperti yang telah disebutkan dalam pustaka bahwa kerusakan DNA yang terjadi akibat radiasi ionisasi adalah ikatan silang protein DNA, ikatan silang pita DNA, oksidasi dan degradasi basa DNA, ikatan gula phospat putus dan rantai DNA baik tunggal maupun ganda terputus (Cotran, 1999).

Kerusakan DNA yang terjadi akibat radiasi ionisasi tersebut merupakan sinyal intrasel yang menginisiasi apoptosis dengan melibatkan aktivasi *p53* (protein 53) (Heinds dan Weinbergs, 1994; Cotran, 1999). *p53* adalah protein

yang mempunyai peran penting dalam regulasi proliferasi sel dan diproduksi serta dikendalikan oleh gen *p53* atau *tumor suppressor gene* (Orem, 1992). Aktivasi *p53* akibat radiasi ionisasi terutama adalah melalui aktivasi gen *ataxia telangiectasia mutated* (gen ATM) (Kubiczek, 1995; Savitsky, 1995); atau dapat juga *p53* mengenali kerusakan tersebut melalui salah satu struktur *domain* yang dimiliki, yaitu pada *carboxy-terminal domain* (Ishizaki, 1994). ATM adalah salah satu protein kinase yang merupakan mediator penting dalam memicu fosforilasi *p53* yang sangat berhubungan dengan kerusakan DNA akibat radiasi ionisasi. *Carboxy-terminal domain* merupakan salah satu dari tiga *domain* dalam struktur *p53* yang berfungsi untuk menempelnya *p53* pada rantai tunggal DNA sehingga *p53* dapat berfungsi lebih lanjut pada proses *cycle cell arrest*, aktivasi protein GADD45 yaitu suatu protein yang bertanggung jawab pada proses perbaikan DNA dan aktivasi protein pro-apoptosis terutama *Bax* pada proses apoptosis.

Kerusakan DNA yang sudah dikenali oleh *p53* dan kemudian *p53* menjadi aktif, selanjutnya *p53* akan mengisyaratkan sel untuk berhenti berproliferasi pada fase G1 dan menghambat sel masuk ke fase S dari siklus sel (Kastan, 1992; Orem, 1992). Penghentian siklus sel pada fase G1 ini tergantung pada *p53* melalui aktivasi protein *p21* yang secara langsung diatur oleh *p53*. *p21* disebut juga *wild type 53 activated fragment 1 (WAF 1)* atau *CDK-Interacting protein 1 (CIP 1)*. *p21* yang teraktivasi akan menekan kompleks *cyclin dependent kinase*, akibatnya tidak terjadi fosforilasi protein Rb (*pRb*) sehingga kompleks *Rb – E2F* tetap stabil, mengakibatkan sel tidak dapat masuk ke fase S. Dengan berhentinya siklus sel, maka *p53* akan memicu sel untuk melakukan perbaikan, yaitu melalui aktivasi GADD-45 (Cotran, 1999). Apabila perbaikan mengalami kegagalan, maka untuk

mencegah defek pertumbuhan berikutnya, *p53* akan mengisyaratkan sel untuk apoptosis.

Apoptosis pada sel yang mendapatkan paparan radiasi ionisasi adalah apoptosis yang terjadi melalui jalur internal atau melalui jalur mitokondria. Dalam hal ini mitokondria melalui beberapa protein yang diekspresikan mempunyai peran sangat penting dalam regulasi proses apoptosis. Apoptosis melalui jalur mitokondria terutama diregulasi oleh protein kelompok *Bcl-2* yang terdapat pada permukaan luar mitokondria. Kelompok protein *Bcl-2* terdiri dari kelompok protein yang pro-apoptosis dan anti-apoptosis. Termasuk kelompok protein pro-apoptosis adalah *Bax*, *Bad* dan *Bid*; sedangkan kelompok protein yang anti apoptosis adalah *Bcl-2* sendiri dan *Bcl-xl* (Robens, 2001; Wang, 2001).

Pada sel yang normal, pada permukaan luar mitokondria terdapat ekspresi protein *Bcl-2* yang berikatan dengan protein *apoptotic protease activating factor-1* (*Apaf-1*) dan *pro-caspase-3*. Seperti yang telah disebutkan diatas, dengan terjadinya kerusakan DNA, maka akan terjadi aktivasi *p53* yang selanjutnya akan mengaktifasi anggota protein kelompok *Bcl-2* yang pro-apoptosis terutama *Bax*. *Bax* yang teraktivasi akan berinteraksi dengan protein *Bcl-2* yang anti-apoptosis. Interaksi tersebut akan menyebabkan *Bcl-2* melepaskan ikatan dengan *apaf-1* dan hal ini akan menyebabkan fungsi normal anti apoptosis terganggu. Interaksi *Bax-Bcl-2* juga akan menyebabkan aktivasi *pro-caspase-3* menjadi *caspase-3*. Interaksi protein pro-apoptosis dan anti apoptosis juga akan menyebabkan *mitochondrial permeability transition pore* (MPTP) terbuka sehingga menyebabkan *cytochrom-c* terlepas. *Cytochrom-c* pada keadaan normal berada diantara membran luar dan membran dalam mitokondria dan berperan sebagai

mediator pada fase eksekusi apoptosis. *Cytochrom-c* yang terlepas akan berikatan dan mengaktifai *apaf-1* dan selanjutnya akan berikatan dan mengaktifai *procaspase-9* menjadi *caspase-9*. Ketiganya kemudian akan membentuk kompleks *cytochrom-c*, *apaf-1*, *caspase-9* dan ATP yang disebut *apoptosom*. Agregasi ini terdapat dalam sitosol. *Caspase* (*cysteine asparatyl spesific protease*) adalah suatu *protease* yang berasal dari residu asam aspartat yang berperan sebagai efektor atau eksekutor serta regulator utama dalam pelaksanaan proses kematian sel. Satu *caspase* yang aktif, maka akan mengaktifkan *caspase* yang lain terutama *caspase-3* (*effector / executor protease*) yang akan menyebabkan aktifitas proteolitik seperti digesti struktur protein pada sitoplasma, digesti DNA menjadi fragmen dengan ujung 3 'OH dan berbagai perubahan morfologis apoptosis. Akhirnya sel yang apoptosis ini akan difagosit oleh sel sehat yang berdekatan (Reed, 2000; Robens, 2001; Wang, 2001; Zamzami dan Kroemer, 2001).

Respon seluler terhadap aktivai *p53* akibat kerusakan DNA setelah paparan radiasi ionisasi; apakah akan terjadi penghentian siklus sel dan kemudian terjadi perbaikan DNA sehingga sel menjadi normal lagi ataukah akan terjadi apoptosis belum dapat diketahui dengan pasti. Beberapa peneliti menyebutkan bahwa hal ini berkaitan dengan tingkat radioresistensi atau radiosensitifitas dari tiap sel. Respon seluler akibat paparan radiasi ionisasi mempunyai perbedaan pada tiap sel, tetapi disepakati bahwa semua jenis sel yang terjadi kerusakan DNA selalu menghasilkan peningkatan *p53* (Kastan, 1992; Clarks, 1993; Lowe, 1993).

Apoptosis yang terjadi pada penelitian ini kemungkinan juga dinisiasi oleh produk biokimia yang berasal dari stres intraseluler. Radikal bebas yang terbentuk akibat radiasi ionisasi merupakan salah satu faktor yang menyebabkan stres

intraseluler yang dapat memberikan sinyal kepada mitokondria sehingga terjadi perubahan pada mitokondria. Perubahan pada mitokondria dimulai pada membran luar yang terbuka, kemudian diikuti oleh pembengkakan matriks dan potensial transmembran hilang, sehingga mitokondria kehilangan fungsi transport elektron. Keadaan ini akan mengakibatkan protein dalam mitokondria seperti *Cytocrom-c* akan terlepas. *Cytocrom-c* yang terlepas akan mengaktifkan *caspase 9* yang kemudian akan menggerakkan proses apoptosis (Green dan Red, 1998; Cotran, 1999).

Pada penelitian ini didapatkan perbedaan yang bermakna peningkatan persentase sel fibroblas jaringan pulpa yang mengalami apoptosis antara kelompok kontrol, kelompok dengan paparan radiasi dosis tunggal 100 rad, kelompok dengan paparan radiasi dosis tunggal 200 rad dan kelompok dengan paparan radiasi dosis tunggal 400 rad. Dalam hal ini peningkatan apoptosis paling tinggi ditemukan pada kelompok yang mendapat paparan radiasi dosis tunggal 200 rad (34,51 %). Pada kelompok dengan paparan radiasi dosis tunggal 100 rad peningkatan sel yang apoptosis lebih rendah (23,69 %) dari kelompok yang mendapat paparan radiasi dosis tunggal 200 rad, tetapi masih lebih tinggi dari kelompok kontrol (6,36 %), namun demikian peningkatan apoptosis sel fibroblas jaringan pulpa ini menurun kembali pada kelompok yang mendapat paparan radiasi dosis tunggal 400 rad. Hasil penelitian ini menunjukkan bahwa persentase sel fibroblas jaringan pulpa yang mengalami apoptosis meningkat seiring dengan peningkatan dosis radiasi ionisasi, tetapi pada dosis tertentu akan mencapai jumlah yang tertinggi dan pada dosis yang lebih tinggi lagi akan terjadi penurunan kembali. Fenomena ini dapat menerangkan bahwa apoptosis hanya terjadi pada

dosis radiasi yang rendah atau sampai batas tertentu saja (dalam penelitian ini sampai dosis 200 rad). Hal ini sesuai dengan keterangan yang sudah ada bahwa apoptosis terjadi pada dosis radiasi yang rendah sampai sedang (Cotran, 1999), sedangkan pada dosis radiasi yang lebih tinggi kematian sel dalam bentuk apoptosis akan menurun dan diperkirakan terjadi peningkatan bentuk kematian sel yang lain, yaitu nekrosis.

Pada paparan radiasi ionisasi dengan dosis yang lebih besar, maka energi foton dari radiasi ionisasi (efek langsung) dan radikal bebas yang terbentuk (efek tidak langsung) tidak saja akan merusak molekul DNA (yang mengarah ke apoptosis), tetapi juga akan merusak molekul dalam sel yang lain terutama molekul penyusun membran sel seperti lipid dan protein, sehingga membran sel akan mengalami kerusakan dan permeabilitas sel akan terganggu. Keadaan ini akan menyebabkan air dan cairan yang lain dengan mudah dapat masuk ke dalam sel, sel akan mengalami pembengkakan (*swelling*) yang hebat dan akhirnya sel akan lisis; kematian sel seperti ini adalah nekrosis. Dengan demikian, pada sel yang mendapatkan paparan radiasi ionisasi dengan dosis yang besar, maka kematian sel dalam bentuk apoptosis akan menurun, namun akan terjadi peningkatan bentuk kematian sel yang lain, yaitu nekrosis.

Faktor lain yang menyebabkan penurunan persentase apoptosis pada kelompok sampel yang mendapat paparan radiasi ionisasi 400 rad adalah karena proses pembersihan atau fagositosis oleh jaringan terhadap sel yang mengalami apoptosis. Hal ini dimungkinkan karena proses apoptosis berlangsung cukup cepat, yaitu hanya berlangsung dalam beberapa jam dan sel selanjutnya akan segera difagosit oleh sel sehat yang berdekatan (Cotran, 1999; Kerr dan Harmon,

1999). Faktor penyebab yang lain adalah karena terjadi hambatan kemampuan regenerasi atau proliferasi sel akibat radiasi ionisasi dengan dosis yang besar. Berdasarkan hukum "Bergonie dan Tribondeau" : sensitifitas jaringan terhadap radiasi berbanding terbalik dengan derajat differensiasi sel, sehingga sel yang aktif berproliferasi akan lebih sensitif terhadap radiasi (Lawler, 1992). Radiasi ionisasi paling efektif membunuh sel yang sedang aktif berproliferasi. Fase yang paling sensitif terhadap radiasi adalah fase mitosis (M) dan fase G₂ dari siklus sel (Lawler, 1992; Cotran, 1999). Fibroblas termasuk sel yang aktif berproliferasi (Roth dan Calmes, 1981). Berdasarkan beberapa alasan tersebut, maka jumlah sel apoptosis yang ditemukan pada penelitian ini hanyalah jumlah sel apoptosis yang terjadi pada saat 24 jam setelah paparan radiasi saja. Jumlah yang sebenarnya dari sel yang mengalami apoptosis tetap sulit diketahui dengan pasti, baik sebelum 24 jam maupun yang setelah 24 jam dari paparan radiasi

Pada kelompok kontrol ternyata juga ditemukan adanya sel fibroblas jaringan pulpa yang mengalami apoptosis. Hal ini juga tidak bertentangan dengan teori dan penelitian yang sudah ada; bahwa apoptosis juga dapat terjadi secara fisiologis, yang salah satunya adalah sebagai mekanisme homeostasis dalam rangka memelihara populasi sel dalam jaringan (Cotran, 1999). Namun berapakah jumlah sel apoptosis yang sebenarnya pada jaringan yang normal belum didapatkan angka yang pasti, tetapi berbagai penelitian pada beberapa jenis sel mendapatkan hasil yang bervariasi. Hal ini dapat dipahami karena tiap sel, tiap jaringan dan bahkan tiap organ mempunyai kekhususan tersendiri sehingga responnya terhadap radiasi ionisasi juga berbeda. Hasil penelitian pada kelompok

kontrol ini kemungkinan sebagian juga dapat terjadi akibat perlakuan pada binatang coba selama pelaksanaan penelitian.

Apoptosis sel fibroblas jaringan pulpa akibat radiasi ionisasi pada penelitian ini dideteksi secara *in-vivo* pada gigi insisifus bawah binatang coba tikus putih strain wistar. Hal ini berbeda sekali dengan apoptosis yang dideteksi secara *in-vitro* pada kultur sel fibroblas. Pada penelitian secara *in-vitro*, paparan radiasi akan secara langsung mengenai biakan sel tanpa ada lapisan jaringan lain yang menghalangi, sehingga biasanya dosis radiasi yang dipaparkan jauh lebih kecil dibandingkan dengan dosis terapi yang biasa digunakan. Pada penelitian secara *in-vivo* paparan radiasi tidak secara langsung mengenai sel fibroblas jaringan pulpa karena banyak sekali lapisan jaringan yang menghalangi, antara lain: dentin, tulang rahang, periodonsium dan lain-lain, sehingga dosis radiasi yang diserap oleh sel fibroblas jaringan pulpa belum tentu sama dengan dosis radiasi yang dipaparkan. Pada penelitian *in-vivo*, sel yang menjadi target penelitian juga berada atau menjadi satu kesatuan dengan berbagai sistem dalam tubuh yang sangat kompleks. Kondisi ini tentu berbeda sekali dengan penelitian secara *in-vitro* pada kultur sel.

Penelitian ini dilakukan pada binatang coba tikus putih strain wistar. Apakah hasil penelitian ini dapat disamakan atau digeneralisasikan pada manusia?, tentu saja hal ini memerlukan penelitian dan pembahasan tersendiri, tetapi perlu diketahui bahwa *lethal dosage* (LD) 50/30 dari tikus adalah 750 rad (Goaz dan White, 1987), sedangkan LD 50/30 manusia dewasa adalah 450 rem (~450 rad; karena faktor kualitas sinar gamma = 1). LD 50/30 adalah dosis radiasi

seluruh tubuh yang bersifat letal pada 50% populasi dalam waktu 30 hari (Edwards, 1990).

Berdasarkan hasil penelitian ini maka usaha pencegahan dan proteksi terhadap radiasi perlu terus ditingkatkan. Pada radioterapi kanker di daerah kepala dan leher, gigi perlu mendapatkan perhatian yang sungguh-sungguh agar kesehatan jaringan pulpa yang mempunyai peran penting dalam menjaga dan mempertahankan kesehatan gigi dapat dilindungi. Mengingat usaha perlindungan terhadap efek samping radioterapi yang sejauh ini belum dapat dilakukan secara penuh, maka diperlukan seleksi indikasi yang ketat untuk perawatan kanker dengan radioterapi.

Penelitian ini hanya mendeteksi apoptosis dan tidak meneliti faktor lain yang berkaitan dengan apoptosis, oleh karena itu perlu juga dilakukan penelitian lanjutan seperti mengenai ekspresi beberapa protein yang terlibat dalam apoptosis dalam rangka untuk melengkapi penjelasan mengenai proses apoptosis khususnya apoptosis sel dalam jaringan pulpa.

BAB 7

KESIMPULAN DAN SARAN

BAB 7

KESIMPULAN DAN SARAN

7.1 Kesimpulan

Terjadi peningkatan persentase apoptosis sel fibroblas jaringan pulpa akibat paparan radiasi ionisasi sesuai dengan peningkatan dosis radiasi dari 0, 100 dan 200 rad, tetapi terjadi penurunan kembali pada dosis radiasi 400 rad. Penurunan apoptosis pada dosis 400 rad diduga disebabkan terjadi peningkatan jenis kematian sel yang lain, yaitu nekrosis.

7.2 Saran

1. Radiasi ionisasi terbukti meningkatkan apoptosis sel fibroblas jaringan pulpa, oleh karena itu diperlukan peningkatan upaya perlindungan terhadap radiasi pada pasien radioterapi; misal dengan mengupayakan peralatan proteksi radiasi yang lebih aman untuk berbagai jaringan termasuk gigi serta melakukan seleksi indikasi radioterapi yang ketat.
2. Perlu dilakukan penelitian lebih lanjut mengenai ekspresi beberapa protein yang terlibat dalam proses apoptosis, seperti *p53*, *Bax*, *caspase* dan protein yang lain.

DAFTAR PUSTAKA

DAFTAR PUSTAKA

- Amsyari F, 1989. *Radiasi Dosis Rendah dan Pengaruhnya Terhadap Kesehatan*. Surabaya: Airlangga University Press, hlm 1-42, 61- 80.
- Barr J.H, Stephens R.G, 1980. *Dental Radiology*. Philadelphia-London-Toronto: W.B Saunders Company, pp 417.
- Bhaskar S.N, 1990. *Orban's Oral Histology and Embriology*. 11th ed., St Louis-Baltimore- Boston etc : Mosby Year Book, pp 139-156.
- Bristow R.G, Benchimol S, Hill R.P, 1996. The p53 Gene As a Modifier of Intrinsic Radiosensitivity: Implication for Radiotherapy. *Radiotherapy and Oncology* : 40 : 197-223.
- Bushong S.C, 1998. *Radiation Protection*. New York-St.Louis-San-Fransisco etc :Mc Graw-Hill, pp 29-37, 75-80.
- Cassarett A.P, 1968. *Radiation Biology*. 1st ed., New Jersey : Prentice Hale Inc, pp 2-210.
- Chen C.Y, Oliner J.D, Zhan Q, Fornace Jr.J.J, Vogelstein B, Kastan M.B, 1994. Interaction Between p53 and MDM2 in a Mammalian Cell Cycle Checkpoint Pathway. *Proc. Acad.Sci.USA* : 91 : 2684 – 2688.
- Clarke A.R, Purdje C.A, Harrison D.J, Morris R.G, Bird C.C, Hooper M.L, Wyllie A.H, 1993. Thimocyte Apoptosis Induced by p53-Dependent an Independent Pathway. *Nature* : 362 : 849 – 852.
- Cohen J.J, 1993. Apoptosis. *Immunol* 14 : 3 : 126-130.
- Cotran R.S, Kumar V, Collins T, 1999. *Robbins Pathologic Basis of Disease*, 6th ed., Philadelphia: W.B Saunder Company, pp 1-28.
- Daniel W.W, 1991. *Biostatistic; a Foundation for Analisis in Health Sciences*. 5th ed., New York: John Willey & Sons, pp: 154-156.
- De Robertis E.D.P, De Robertis E.M.F, 1980. *Cell and Molecular Biology*. 7th ed., Japan-Philadelphia-Tokyo: Saunders Collage-Holt Saunders, pp 69-93.
- Dileonardo A, Linke S.P, Charkin K, Wahl G.M, 1994. DNA Damage Triggers a Prolonged p53-Dependent G1 Arrest and Long-term Induction of Cip1 in Normal Human Fibroblats. *Gen Dev* : 8 : 2540 – 2551.

- Dimitrijevic-Bussod M, Viviana S, Balzaretto-Maggi, Gadbois D.M, 1999. Extracellular Matrix and Radiation G₁ Cell Cycle Arrest in Human Fibroblasts. *Cancer Research* : 59 :4843-4847
- Djarwanto, 2001. *Mengenal Beberapa Uji Statistika dalam Penelitian*. Edisi 2, Yogyakarta: Liberty, hlm 163-168.
- Dulic V, Kaufmann W.K, Wilson S.J, Tlsty T.D, Lees E, Harper J.W, Elledge S.J, Reed S.I, 1994. p53-Dependent Inhibition of Cyclin-Dependent Kinase Activities in Human Fibroblasts During Radiation G₁ Arrest. *Cell* : 76 : 1013-1023
- Edwards C, Statkiewicz S.M.A, Ritenour E.R, 1990. *Perlindungan Radiasi Bagi Pasien dan Dokter Gigi*. Jakarta: Widya Medika, hlm 4-10, 69-117.
- Farris E.J, Griffith J.Q, 1971. *The Rat in Laboratory Investigation*. New York: Hafner Publishing Company, pp 104-120, 147.
- Furqon, 1997. *Statistika Terapan untuk Penelitian*. Bandung:Alfabeta, hlm 186-202
- Gadbois D.M, Crissman H.A, Nastasi A, Habbersett R, Wang S, Chen D, Lehnert B.E, 1996. Alterations in The Progression of Cell Through The Cell Cycle After Exposure to α Particles or γ Rays. *Radiat. Res.*: 146 : 414-424
- Goaz P.W, White S.C, 1987. *Oral Radiology: Principles and Interpretation*. St Louis-Toronto-London: The C.V. Mosby Company, pp 44-62.
- Green D.R, Reed J.C, 1998. Mitochondria and Apoptosis. *Science* ; 281: 72-75.
- Hassan K, Khier S, 1997. Effect of Therapeutic Gamma Radiation on Diametral Tensile Strength and Microhardness of Photo-Cured Glass Ionomer Cement. *The Saudi Dental Jurnal*: 9: 3:120-124.
- Hendarti H.T, Kartabrata M.D, Sri Ayu, 2001. Dampak Terapi Radiasi Kanker Kepala dan Leher Terhadap Timbulnya Kandidiasis Mulut. *Majalah Kedokteran Gigi (Dental Journal)*:34:3a:192-194.
- Hendratta J.H, 2003. Efek Radioterapi Kanker Kepala dan Leher Terhadap Jaringan Dalam Mulut. *Meditek* : 11 : 29 : 29 – 35.
- Hinds P.W, Weinberg R.A, 1994. Tumor Supressor Gene. *Curr Opinion Genet Dev* : 4 : 135 – 141.
- Intergen Technical Crew, 2001. *The Complete Apoptag Manual*. Intergen Company, pp 1-16.

- Ishizaki K, Ejima Y, Matsunaga T, Hara R, Sukamoto A, Ikenaga M, Ikawa Y, Aizawa S, 1994. Increased UV-Induced SCEs But Normal Repair of DNA Damage in p53-Deficient Mouse Cells. *Int. J. Cancer* : 58 : 254 – 257.
- Kastan M, Zhan Q, El-Deiry W.S, Carrier F, Jacks T, Wals W.V, Plunkett B.S, Vogelstein B, Fornace A.J Jr, 1992. A Mammalian Cell Cycle Checkpoint Pathway Utilizing p53 and GADD45 is Defective in Ataxia - Telangiectasia. *Cell* : 71 : 587 – 597.
- Kerr J.F.R, Harmon B.V, 1991. **Definition and Incidence of Apoptosis: An Historical Perspective.** In : Tomei L.D, Cope F.O (eds) *Apoptosis: the Molecular Basis of Cell Death.* Cold Spring Harbor, NY : 1 – 29.
- Kidd E.A.M, Bechal S.J, 1992. *Dasar-Dasar Karies: Penyakit dan Pencegahannya.* Terjemahan dari: **Essentials of Dental Caries: The Disease and Its Management.** Alih Bahasa: Narlan S dan Faruk S, Jakarta: EGC, hlm 33-37.
- Kimmeldorf D.J, Jones D.J, Castanera T.J, 1963. The Radiobiology of Teeth. *Radiat. Res.*:20:518-540.
- Koppang H.S, 1973. The Radiosensitive Stages of The Rat Incisor Odontoblast as Demonstrated by Autoradiography. *Scand. J. Dent. Rest.* 81: 303-314.
- Lawler W, Ali Ahmed, Hume W.J, 1992. *Buku Pintar Patologi untuk Kedokteran Gigi.* Jakarta: EGC, hlm 5-6, 57-61.
- Leeson C.R, Leeson T.S, Paparo A.A, 1990. *Buku Ajar Histologi.* Edisi 5, Jakarta: EGC, hlm 6-12, 116-117, 336–337.
- Levine a.J, 1995. Tumor Suppressor Gene. *Scientific American Science & medicine* : 28-37.
- Liben P, 1992. *Pengetahuan Teknik Laboratorium.* Surabaya : Pascasarjana Universitas Airlangga, hal 7-35.
- Lowe S.M, Ruley H.E, Jacks T, Housman D.E, 1993. P53-Dependent Apoptosis Modulates The Cytotoxicity of Anticancer Agents. *Cell* : 74 : 957 – 967.
- Lukman D, 1991. *Dasar-Dasar Radiologi Dalam Ilmu Kedokteran Gigi.* Edisi 3, Jakarta: Widya Medika, hlm 30-40.
- Melfi R.C, 1988. *Permar's Oral Embrional and Microscopic Anatomy.* 8th ed., Philadelphia : Lea and Febiger, pp 131-143.

- Morse D.R, 1991. Age-Related Change of The Dental Pulp Complex and Their Relationship to Sistemic Aging. *Oral Surgery. Oral Med. Oral pathol*:72:721-745.
- Mould R.F, 1985. *Radiation Protection In Hospital*, Bristol-Boston: Adam Hilger Ltd, pp 7-25.
- Nakamura M, Kanemoto K, Yui K, Kamijo R, Kakuta S, Kurachi Y, Magumo M, 1997. Immunohistochemical Study on Oral Leukoplakia-Corelation of Epithelial. *Dentistry in Japan* : 34 : 65 – 68.
- Nugrahaningsih W.H, 2004. Ekspresi Protein Bcl-2 pada Kanker Mamma. *Media-Medika Indonesiana* : 39 : 1 : 53 – 57.
- Orem M, 1992. P53 : The Ultimate Tumor Supressor Gene. *FASEB* : 6 : 3169-3176.
- Pratama C.S, 1994. Pengaruh Radiasi Pengion Dosis Tunggal Pada Sel Odontoblas Gigi Insisif Tikus Putih . *Tesis*, Surabaya:Pascasarjana Universitas Airlangga.
- Raff M.C, 1992. Social Controls on Cell Survival and Cell Death. *Nature* : 366 : 397 – 400.
- Rasad S.J, Kartoleksono S, Ekayuda I, 1999. *Radiologi Diagnostik*. Jakarta: FKUI, hlm 15-16, 25-27.
- Ratridewi I, 2001. Perbedaan Efek Radiasi Eksternal antara Dosis Tunggal dan Dosis Fraksinasi terhadap Apoptosis Spermatogonia dan Ekspresi p53 pada Mencit Jantan. *Tesis*, surabaya : Pascasarjana Universitas Airlangga.
- Reed J.C, 2000. Mechanism of Apoptosis. *American Journal of Pathology* : 157 : 5 : 1415 – 1430.
- Robens, 2001. Apoptosis. [URI]. [http:// www. Geocities. com / collegePark / lab / bcl-2 . htm](http://www.Geocities.com/collegePark/lab/bcl-2.htm) . 2000.
- Renehan A.G, Booth C, Potten C.D, 2001. What is Apoptosis, and Why is It Important. *BMJ* ;322 ; 1536-1538.
- Roth GI, Calmes R, 1981. *Oral Biology*. St.Louis-Toronto-London: The C.V. Mosby Company, pp 119-128, 143.
- Savitsky K, 1995. A Single Ataxia Talangiectasia Gene with a Product Similar to P1-3 Kinase. *Science* : 268 : 1749 – 1753.

- Smith J.B, Mangkoewidjojo S, 1988. *Pemeliharaan, Pembiakan dan Penggunaan Hewan Percobaan di Daerah Tropis*. Jakarta : Universitas Indonesia, hlm 10-119.
- Sudira M, 1989. *Proteksi Radiasi*. Denpasar: Bagian Radiologi FK Udayana.
- Sulistiyani E, 2002. Peningkatan Apoptosis dan Ekspresi p53 pada Sel Asinar Kelenjar Parotis sebagai Dasar Patogenesis Xerostomia pada Terapi Radiasi. *Tesis*, Surabaya: Pascasarjana Universitas Airlangga.
- Sukmawan R, Kalim H, Kusmana D, 2004. Mekanisme Seluler Apoptosis dan Nekrosis pada Patofisiology Gagal Jantung. *Medika* : 6 : th xxx : 384 – 389.
- Tauhid N.A, Indra Wijaya, Ahmad Zulfa, 2000. *Dasar Biologi Molekuler*. Semarang : Badan Penerbit Universitas Diponegoro.
- Underwood J.C.E, 1999. *Patologi Umum dan Sistemik*. Edisi 2, Volume 1, Terjemahan dari: **General and Sistemik Pathology**. Alih Bahasa: Sarjadi, Editor: Sarjadi, Jakarta: EGC, hlm 120-123, 132-140.
- Upton A.C, 1982. The Biological Effects of Low Level Ionizing Radiation. *Scientific American*: 246: 29-37.
- Van Rensburg B.G.J, 1995. *Oral Biology*. Chicago-Berlin-London etc : Quistessence Publishing Co, Inc, pp 317-320.
- Van Zutphen L.F.M, Baumans V, Beynen A.C, 1993. *Principles of Laboratory Animal Science*. Amsterdam-London-New York-Tokyo: Elsevier, pp 17-45.
- Wang X, 2001. The Expanding Role of Mitochondria in Apoptosis. *Gen Dev* : 15 : 2922 – 2933.
- Whaites E, Cawson R.A, 1992. *Essentials of Dental Radiography and Radiology*. Eidenburgh-London-Madrid etc : Churchill Livingstone, pp 25-28.
- Zamzami N, Kroemer G, 2001. The Mitochondrion in Apoptosis : How Pandora's Box Opens. *Molecular Cell Biology* : 2 : 7 – 11.
- Zainuddin M, 2000, *Metodologi Penelitian*. Surabaya: Pascasarjana Universitas Airlangga.

LAMPIRAN

MILIE
PERPUSTAKAAN
UNIVERSITAS AIRLANGGA
SURABAYA

Lampiran 1. Perhitungan besar sampel

Besar sampel pada penelitian ini ditentukan dengan menggunakan rumus sebagai berikut (Daniel, 1991):

$$n = \frac{Z^2 \cdot \sigma^2}{d^2}$$

Keterangan:

n = Besar sampel

Z^2 = Nilai Z pada tingkat kesalahan tertentu (α); jika $\alpha = 0,05$ maka nilai $Z = 1,96$ (2-tailed) atau $Z = 1,64$ (1-tailed)

σ = Standar deviasi (SD) penelitian sejenis sebelumnya; pada penelitian ini SD = 0,88 (Pratama, 1994)

d = Kesalahan yang masih dapat ditoleransi; pada penelitian ini digunakan $d = 0,75 \times SD = 0,66$

Berdasarkan rumus tersebut diperoleh besar sampel:

$$\begin{aligned} n &= \frac{(1,64)^2 \cdot (0,88)^2}{(0,66)^2} \\ &= \frac{2,66 \cdot 0,7}{0,4356} \\ &= 4,29 \end{aligned}$$

Lampiran 2. Teknik pemrosesan jaringan dengan teknik rutin untuk pembuatan sediaan histologi (Leeson dkk., 1991; Liben, 1992).

Pemrosesan jaringan dengan teknik rutin untuk pembuatan sediaan histologi diperlukan tahap-tahap sebagai berikut:

1. Melakukan proses fiksasi, pencucian, dehidrasi, *clearing* dan infiltrasi dengan mencelupkan jaringan ke dalam larutan seperti tertera dalam tabel dibawah ini sesuai waktu yang ditentukan.

Tahapan	Bahan	Waktu	Tujuan
Fiksasi	Formalin Buffer 10%.	48 jam	Mencegah dekomposisi jaringan Mempertahankan jaringan seperti keadaan saat hidup
Pencucian	Air mengalir	1,5 jam	Menghilangkan sisa-sisa bahan fiksasi
Dehidrasi	Alkohol 70%	1 jam	Menarik air dari jaringan yang sudah difiksasi
	Alkohol 80%	1 jam	
	Alkohol 95%	1 jam	
	Alkohol 100%	1 jam	
	Alkohol 100%	1 jam	
<i>Clearing</i>	Xylene	0,5-1 jam	Menghilangkan alkohol sebelum jaringan ditanam dalam parafin
	Xylene	0,5-1 jam	
Infiltrasi	Parafin cair	1,5 jam	Sebagai penyangga sediaan agar dapat dilakukan penyayatan
	Parafin cair	1,5 jam	

2. Pembuatan Blok (*Embedding*)

1. Persiapkan alat cetak yang dapat terbuat dari plastik, sepasang logam berbentuk L atau dari kotak kertas.
2. Alat cetak diolesi dengan bahan separator (misalnya gliserin).
3. Pada cetakan dipasang label untuk identifikasi.

4. Parafin yang telah dicairkan dengan pemanasan dimasukkan ke dalam cetakan sampai penuh.
 5. Jaringan ditempatkan pada posisi yang diinginkan dalam parafin tersebut.
 6. Parafin didinginkan dengan air yang dingin.
 7. Bila parafin sudah cukup keras, alat cetak dilepaskan dari blok parafin tersebut. Parafin yang berlebihan dipotong dengan menyisakan sedikitnya 2 mm parafin dari tepi jaringan yang diblok.
3. Pemotongan blok parafin dengan mikrotom
1. Perhatikan letak jaringan dalam blok parafin. Perhatikan sisi blok mana yang akan dipotong. Blok bagian belakang yang harus dilekatkan pada logam pemegang blok dari mikrotom.
 2. Letakkan blok parafin pada logam pemegang blok dengan jalan memanaskan logam tersebut dan menekannya pada blok parafin, kemudian didinginkan dengan mencelupkan ke dalam air agar parafin yang mencair membeku kembali.
 3. Pasang pemegang blok pada mikrotom
 4. Pasang pisau mikrotom pada posisinya dan atur indikator yang menunjukkan ketebalan pemotongan. Ketebalan pemotongan atau penyayatan secara rutin adalah 6-10 mikron.
 5. *Water bath* dipersiapkan dengan mengatur suhu air dibawah titik leleh parafin yaitu 48°C.

6. Hasil pemotongan berupa pita tipis. Kemudian dengan hati-hati pindahkan pita sayatan jaringan tersebut ke dalam *water bath* menggunakan pinset kecil agar sayatan dapat mengembang dengan baik.
7. Sediakan gelas obyek yang bersih, kemudian lapisi gelas obyek tersebut dengan polilisin sebagai perekat dan biarkan kering.
8. Seleksi sayatan jaringan yang akan diambil, celupkan gelas obyek ke bawah pita sayatan jaringan dan angkat sayatan tersebut dengan gelas obyek (sedapatnya posisinya tepat ditengah gelas obyek). Berikan label pada gelas obyek tersebut sesuai dengan label pada blok.
9. Sediaan dibiarkan kering dan dimasukkan ke dalam oven dengan suhu 58°C - 60°C selama 30 menit dan sediaan siap untuk dilakukan pengecatan.

Lampiran 3. Prosedur pemrosesan jaringan dengan *S7101 Apoptag Plus Peroxidase In Situ Apoptosis Detection Kit* (Intergen Company, 2001).

Sediaan yang telah diproses secara rutin (pada lampiran 1) dilanjutkan dengan tahapan sebagai berikut:

1. Deparafinisasi jaringan

1. Spesimen dicuci dengan *Xylene* 3 kali masing-masing selama 5 menit.
2. Cuci spesimen 2 kali dengan etanol absolut masing-masing selama 5 menit
3. Cuci spesimen dengan etanol 95% dan satu kali dengan etanol 70% masing-masing selama 3 menit.
4. Cuci spesimen dengan PBS selama 5 menit.

2. Persiapan jaringan

1. Teteskan *proteinase K* (20 μ g/ml) ke spesimen (60 μ /5 cm²) selama 15 menit, inkubasi dalam 37°C.
2. Cuci spesimen 2 kali dengan dH₂O dalam *coplin jar* masing-masing 2 menit.

3. Menghilangkan *endogenous peroksidase*

1. Teteskan 3% H₂O₂ dalam PBS selama 5 menit pada suhu kamar.
2. Cuci spesimen 2 kali dengan PBS masing-masing selama 2 menit dalam *coplin jar*.

4. Aplikasi *equibration buffer*

1. Hilangkan kelebihan cairan di sekitar potongan jaringan dengan hati-hati menggunakan kertas pengering.

2. Segera aplikasikan *equibration buffer* 75 μl secara langsung pada spesimen.
 3. Inkubasikan paling sedikit 10 detik pada suhu kamar.
5. Aplikasi *Working Strength TdT Enzym*
1. Hilangkan kelebihan cairan di sekitar potongan jaringan dengan hati-hati menggunakan kertas pengering.
 2. Segera teteskan *Working Strength TdT Enzym* 55 $\mu\text{l}/5\text{ cm}^2$ pada jaringan.
 3. Inkubasikan pada suhu 37°C pada wadah yang lembab selama 1 jam.
6. Aplikasi *Stop/Wash Buffer*
1. Letakkan spesimen dalam *coplin jar* yang berisi *Working Stregth Stop/Wash Buffer*, goyangkan selama 15 detik kemudian inkubasi selama 10 menit pada suhu kamar.
 2. Siapkan *Anti-Digoxigenin Peroxidase Conjugate* dari tempat penyimpanan dan hangatkan pada suhu kamar.
7. Aplikasi *Anti-Digoxigenin Peroxidase Conjugate*
1. Cuci spesimen sebanyak 3 kali dalam PBS yang berbeda masing-masing 1 menit.
 2. Hilangkan kelebihan cairan diantara potongan jaringan secara hati-hati dengan kertas pengering.
 3. Teteskan *Anti-Digoxigenin Peroxidase Conjugate* pada sediaan, gunakan kira-kira 65 $\mu\text{l}/5\text{ cm}^2$ dari permukaan spesimen.
 4. Inkubasikan dalam tempat yang lembab selama 30 menit pada suhu kamar.

8. Pencucian dalam larutan PBS

1. Cuci spesimen 4 kali dengan PBS dalam *coplin jar* masing-masing selama 2 menit pada suhu kamar.
2. Selama mencuci sediaan, siapkan *Working strength Peroxidase Substrate*.

9. Pemberian Warna pada sediaan dengan *Peroxidase Substrate*

1. Hilangkan kelebihan cairan diantara potongan jaringan secara hati-hati dengan kertas pengering.
2. Aplikasikan secukupnya *Peroxidase Substrate* sampai menutupi seluruh permukaan jaringan ($75 \mu\text{l}/5 \text{ cm}^2$).
3. Pewarnaan dilakukan selama 3-6 menit pada suhu kamar.
4. Untuk menentukan waktu pewarnaan yang optimal, monitor timbulnya warna dengan melihat slide dibawah mikroskop cahaya.

10. Cuci spesimen

1. Cuci spesimen 3 kali dengan dH_2O dalam *coplin jar* masing-masing selama 1 menit.
2. Inkubasi slide dengan dH_2O dalam *coplin jar* selama 5 menit pada suhu kamar.

11. Pemberian *Counterstain specimen*

1. *Counterstain* dalam 0,55 (w:v) *Methyl Green* dalam *coplin jar* selama 10 menit pada suhu kamar.

2. Cuci spesimen 3 kali dengan dH₂O dalam *coplin jar*, masukkan slide 10 kali masing-masing dalam pencucian pertama dan kedua, lanjutkan dengan 30 detik tanpa digoyangkan dalam pencucian ketiga.
3. Cuci spesimen 3 kali dengan N-Butanol 100% dalam *coplin jar*, masukkan slide 10 kali masing-masing dalam pencucian pertama dan kedua, lanjutkan dengan 30 detik tanpa digoyangkan dalam pencucian ketiga.

12. *Mount specimen*

1. Keringkan spesimen dengan menggerakkan slide dalam 3 botol *Xylene*, masing-masing inkubasikan selama 2 menit.
2. Hilangkan cairan diantara sediaan dengan kertas pengering.

13. Amati di bawah mikroskop

Lampiran 4. Data hasil penelitian

1. Data hasil penelitian pengamat 1

Smpl	Kontrol			Kelompok 1			Kelompok 2			Kelompok 3		
	1 st	2 nd	Mean	1 st	2 nd	Mean	1 st	2 nd	Mean	1 st	2 nd	Mean
1	4.12	4.50	4.31	19,67	23,15	21,41	35,11	33,33	34,22	19,27	15,38	17,32
2	7.27	6.66	6.96	26,31	23,07	24,69	38,00	34,48	36,24	19,64	18,91	19,27
3	5.76	6.81	6.28	24,71	24,44	24,57	34,21	35,71	34,96	21,33	15,85	18,59
4	6.77	8.45	7.61	23,88	22,91	23,35	32,35	31,25	31,80	19,76	14,28	17,02
5	7.35	6.34	6.64	23,43	22,58	23,00	38,54	31,19	34,86	18,51	17,24	17,87
6	8.04	4.68	6.36	22,72	27,63	25,17	37,50	32,50	35,00	18,88	15,00	16,94
Mean			6.39			23,69			34,51			17,83

2. Data hasil penelitian pengamat 2

Smpl	Kontrol			Kelompok 1			Kelompok 2			Kelompok 3		
	1 st	2 nd	Mean	1 st	2 nd	Mean	1 st	2 nd	Mean	1 st	2 nd	Mean
1	5,10	4,71	4,90	21,66	26,08	23,87	36,19	32,30	34,24	18,88	14,63	16,75
2	7,01	5,66	6,33	25,64	24,50	25,07	32,14	36,36	34,25	20,00	18,66	19,33
3	4,54	8,69	6,61	22,22	25,00	23,61	33,33	35,78	34,55	22,85	19,44	21,14
4	4,93	6,74	5,83	21,42	22,22	21,82	29,41	34,28	31,84	20,23	16,25	18,24
5	6,66	8,33	7,49	25,00	26,66	25,81	29,50	37,50	33,50	20,00	17,14	18,57
6	5,06	5,95	5,50	23,61	25,00	24,30	34,21	34,72	34,46	19,14	14,28	16,71
Mean			6,11			24,08			33,80			18,46

3. Data hasil penelitian pengamat 3

Smpl	Kontrol			Kelompok 1			Kelompok 2			Kelompok 3		
	1 st	2 nd	Mean	1 st	2 nd	Mean	1 st	2 nd	Mean	1 st	2 nd	Mean
1	4,25	5,45	4,83	22,22	23,80	23,01	33,60	35,71	34,65	20,73	18,42	19,57
2	7,27	5,66	6,46	27,35	23,07	25,21	38,46	37,03	37,74	21,81	18,75	20,28
3	8,33	5,76	7,04	27,58	20,00	23,79	33,33	34,69	34,01	19,73	18,66	19,19
4	6,66	8,33	7,49	21,27	21,95	21,61	34,28	33,33	33,80	19,11	17,10	18,10
5	4,76	6,06	5,41	24,32	20,37	22,34	33,33	40,00	36,66	17,85	19,35	18,60
6	5,79	8,04	6,91	21,73	18,88	20,30	32,43	36,11	34,27	16,94	17,77	17,35
Mean			6,36			22,71			35,15			18,84

	1	2	3	\bar{x}	1	2	3	\bar{x}	1	2	3	\bar{x}	1	2	3	\bar{x}
1	4,31	4,90	4,83	4,68	21,41	23,17	25,21	24,99	36,24	34,25	37,74	34,37	17,32	16,75	19,57	17,88
2	6,96	6,33	6,46	6,58	24,69	25,07	25,21	24,99	36,24	34,25	37,74	36,07	19,27	19,33	20,28	19,62
3	6,28	6,61	7,04	6,64	24,57	23,61	23,79	23,99	34,96	34,55	34,01	34,50	18,59	21,14	19,19	19,64
4	7,61	5,83	7,49	6,97	23,35	21,82	21,61	22,26	31,80	31,84	33,80	32,84	17,02	18,24	18,10	17,78
5	6,64	7,49	5,41	6,58	23,00	25,81	22,34	23,72	34,86	33,50	36,66	35,00	17,87	18,57	18,60	18,34
6	6,36	5,50	6,91	6,25	25,17	24,30	20,30	23,25	35,00	34,46	34,27	34,57	16,94	16,71	17,35	17,00
\bar{x}				6,28				23,50				34,55				18,38

lampiran 5. Uji normalitas, homogenitas dan *one-way anova* data hasil penelitian pengamat 1, 2 dan 3

lore

Case Processing Summary

	Cases					
	Valid		Missing		Total	
	N	Percent	N	Percent	N	Percent
el. Kontrol	18	100.0%	0	.0%	18	100.0%
el. I	18	100.0%	0	.0%	18	100.0%
el. II	18	100.0%	0	.0%	18	100.0%
el. III	18	100.0%	0	.0%	18	100.0%

Tests of Normality

	Kolmogorov-Smirnov ^a			Shapiro-Wilk		
	Statistic	df	Sig.	Statistic	df	Sig.
el. Kontrol	.169	18	.191	.946	18	.409
el. I	.095	18	.200*	.964	18	.643
el. II	.198	18	.060	.920	18	.158
el. III	.126	18	.200*	.952	18	.461

*. This is a lower bound of the true significance.

a. Lilliefors Significance Correction

ray

Descriptives

Kontrol

	N	Mean	Std. Deviation	Std. Error	95% Confidence Interval for Mean		Minimum	Maximum
					Lower Bound	Upper Bound		
)	6	6.3600	1.1144	.4550	5.1905	7.5295	4.31	7.61
)	6	6.1100	.9075	.3705	5.1577	7.0623	4.90	7.49
)	6	6.3567	1.0291	.4201	5.2767	7.4366	4.83	7.49
al	18	6.2756	.9662	.2277	5.7951	6.7560	4.31	7.61

Test of Homogeneity of Variances

Kontrol

Levene Statistic	df1	df2	Sig.
.077	2	15	.926

ANOVA

Kontrol

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
etween Groups	.247	2	.123	.118	.889
thin Groups	15.622	15	1.041		
al	15.869	17			

way

Descriptives

.1

	N	Mean	Std. Deviation	Std. Error	95% Confidence Interval for Mean		Minimum	Maximum
					Lower Bound	Upper Bound		
0	6	23.6983	1.3967	.5702	22.2325	25.1641	21.41	25.17
0	6	24.0800	1.3707	.5596	22.6415	25.5185	21.82	25.81
0	6	22.7100	1.7124	.6991	20.9130	24.5070	20.30	25.21
al	18	23.4961	1.5303	.3607	22.7351	24.2571	20.30	25.81

Test of Homogeneity of Variances

.1

Levene Statistic	df1	df2	Sig.
.210	2	15	.813

ANOVA

.1

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
etween Groups	5.999	2	2.999	1.331	.294
thin Groups	33.810	15	2.254		
al	39.809	17			

eway

Descriptives

Kel. II

	N	Mean	Std. Deviation	Std. Error	95% Confidence Interval for Mean		Minimum	Maximum
					Lower Bound	Upper Bound		
1.00	6	34.5133	1.4823	.6051	32.9578	36.0689	31.80	36.24
2.00	6	33.8067	1.0320	.4213	32.7236	34.8897	31.84	34.55
3.00	6	35.1883	1.6202	.6615	33.4880	36.8887	33.80	37.74
Total	18	34.5028	1.4382	.3390	33.7876	35.2180	31.80	37.74

Test of Homogeneity of Variances

Kel. II

Levene Statistic	df1	df2	Sig.
.842	2	15	.450

ANOVA

Kel. II

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	5.728	2	2.864	1.459	.264
Within Groups	29.438	15	1.963		
Total	35.166	17			

neway

Descriptives

Kel. III

	N	Mean	Std. Deviation	Std. Error	95% Confidence Interval for Mean		Minimum	Maximum
					Lower Bound	Upper Bound		
1.00	6	17.8350	.9339	.3813	16.8549	18.8151	16.94	19.27
2.00	6	18.4567	1.6725	.6828	16.7015	20.2119	16.71	21.14
3.00	6	18.8483	1.0539	.4303	17.7423	19.9544	17.35	20.28
Total	18	18.3800	1.2611	.2972	17.7529	19.0071	16.71	21.14

Test of Homogeneity of Variances

Kel. III

Levene Statistic	df1	df2	Sig.
.790	2	15	.472

ANOVA

Kel. III

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	3.133	2	1.567	.983	.397
Within Groups	23.901	15	1.593		
Total	27.035	17			

mpiran 6. Uji normalitas, homogenitas dan *one-way anova* data hasil penelitian pengamat 1.

lore

Case Processing Summary

	Cases					
	Valid		Missing		Total	
	N	Percent	N	Percent	N	Percent
asil Pengamatan	24	100.0%	0	.0%	24	100.0%

Tests of Normality

	Kolmogorov-Smirnov ^a			Shapiro-Wilk		
	Statistic	df	Sig.	Statistic	df	Sig.
asil Pengamatan	.143	24	.200*	.916	24	.052

*. This is a lower bound of the true significance.

a. Lilliefors Significance Correction

way

Descriptives

asil Pengamatan

	N	Mean	Std. Deviation	Std. Error	95% Confidence Interval for Mean		Minimum	Maximum
					Lower Bound	Upper Bound		
. Kontrol	6	6.3600	1.1144	.4550	5.1905	7.5295	4.31	7.61
. I	6	23.6983	1.3967	.5702	22.2325	25.1641	21.41	25.17
. II	6	34.5133	1.4823	.6051	32.9578	36.0689	31.80	36.24
. III	6	17.8350	.9339	.3813	16.8549	18.8151	16.94	19.27
total	24	20.6017	10.4526	2.1336	16.1879	25.0154	4.31	36.24

Test of Homogeneity of Variances

asil Pengamatan

Levene Statistic	df1	df2	Sig.
.402	3	20	.753

ANOVA

asil Pengamatan

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
etween Groups	2481.620	3	827.207	528.375	.000
ithin Groups	31.311	20	1.566		
total	2512.931	23			

st Hoc Tests

mpiran 7. Uji statistik *Least Significant different* (LSD)

Multiple Comparisons

pendent Variable: Hasil Pengamatan

Kelompok	(J) Kelompok	Mean Difference (I-J)	Std. Error	Sig.	95% Confidence Interval	
					Lower Bound	Upper Bound
Kontrol	Kel. Kontrol					
	Kel. I	-17.3383*	.7224	.000	-18.8452	-15.8314
	Kel. II	-28.1533*	.7224	.000	-29.6602	-26.6464
	Kel. III	-11.4750*	.7224	.000	-12.9819	-9.9681
I. I	Kel. Kontrol	17.3383*	.7224	.000	15.8314	18.8452
	Kel. I					
	Kel. II	-10.8150*	.7224	.000	-12.3219	-9.3081
	Kel. III	5.8633*	.7224	.000	4.3564	7.3702
I. II	Kel. Kontrol	28.1533*	.7224	.000	26.6464	29.6602
	Kel. I	10.8150*	.7224	.000	9.3081	12.3219
	Kel. II					
	Kel. III	16.6783*	.7224	.000	15.1714	18.1852
I. III	Kel. Kontrol	11.4750*	.7224	.000	9.9681	12.9819
	Kel. I	-5.8633*	.7224	.000	-7.3702	-4.3564
	Kel. II	-16.6783*	.7224	.000	-18.1852	-15.1714
	Kel. III					

*. The mean difference is significant at the .05 level.



