

1. APOPTOSIS
2. XEROSTOMIA
3. RADIOTHERAPY.

KK
TKD 01/02
Sul
P

TESIS

PENINGKATAN APOPTOSIS DAN EKSPRESI p53 PADA SEL ASINAR KELENJAR PAROTIS SEBAGAI DASAR PATOGENESIS XEROSTOMIA PADA TERAPI RADIASI

PENELITIAN EKSPERIMENTAL PADA MENCIT BALB/c JANTAN



MILIK
PERPUSTAKAAN
UNIVERSITAS AIRLANGGA
SURABAYA

ERNA SULISTYANI

**PROGRAM PASCASARJANA
UNIVERSITAS AIRLANGGA
SURABAYA
2002**

**PENINGKATAN APOPTOSIS DAN EKSPRESI p53
PADA SEL ASINAR KELENJAR PAROTIS
SEBAGAI DASAR PATOGENESIS XEROSTOMIA PADA
TERAPI RADIASI**

PENELITIAN EKSPERIMENTAL PADA MENCIT BALB/c JANTAN

TESIS

Untuk memperoleh Gelar Magister
dalam Program Studi Ilmu Kedokteran Dasar
pada Program Pascasarjana Universitas Airlangga

Oleh :

**ERNA SULISTYANI
NIM : 099913297M**

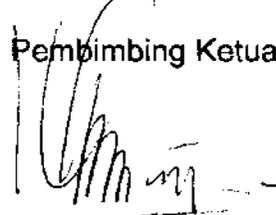
**PROGRAM PASCASARJANA
UNIVERSITAS AIRLANGGA
SURABAYA
2002**

Tanggal 21 Januari 2002

TESIS INI TELAH DISETUJUI
PADA TANGGAL 31 JANUARI 2002

Oleh

Pembimbing Ketua



Dr. Suhartono Taat Putra, dr., MS.
NIP. 130934628

Pembimbing



Dr. Ketut Sudiana, drs., MS.
NIP. 130877636

Mengetahui

Ketua Program Studi Ilmu Kedokteran Dasar
Program Pascasarjana Universitas Airlangga



Dr. Ketut Sudiana, dr., MS, PhD
NIP. 130687606

Telah diuji

Tanggal 21 Januari 2002

Panitia Penguji Tesis

Ketua : Prof. Soegeng Soekamto M, dr., MS., PhD.

Anggota : 1. Dr. Suhartono Taat Putra, dr., MS.
2. Dr. Ketut Suidiana, drs., MS.
3. Prof. Dr. H. Sarmanu, drh., MS.
4. Dr. Hadi Soenartyo, drg., MSc.



UCAPAN TERIMA KASIH

Puji syukur alhamdulillah saya panjatkan kepada Allah SWT, yang dengan rahmad dan ridlo-Nya saya dapat menyelesaikan pendidikan program magister dan menyelesaikan tesis ini. Pada kesempatan ini saya ingin mengucapkan terima kasih yang sebesar-besarnya kepada:

1. Dr. Suhartono Taat Putra, dr., MS., yang bukan hanya selalu sabar dan bijak sebagai pembimbing utama penyusunan tesis ini, tetapi juga sebagai guru yang patut digugu dan ditiru dalam membimbing saya untuk bisa menjadi menjadi insan yang lebih dewasa.
2. Dr. Ketut Sudiana, drs., MS., pembimbing kedua dalam penyusunan tesis ini, yang waktunya banyak tersita dalam membimbing dan membantu saya, baik dalam penyusunan maupun dalam proses eksperimen di laboratorium. Beliau selalu terbuka kapan saja saya memerlukan tempat bertanya, teman berdiskusi maupun dorongan semangat untuk terus melanjutkan penelitian.
3. Pemerintah Negara Republik Indonesia yang telah memberikan dana BPPS, Rektor Universitas Airlangga, Direktur Program Pasca Sarjana Universitas Airlangga, Rektor Universitas Jember dan Dekan Fakultas Kedokteran Gigi Universitas Jember, yang telah memberikan kesempatan untuk dapat menempuh pendidikan program Magister ini.
4. Prof. Soegeng Soekamto dr., MS., PhD. yang membantu saya dalam mendapatkan fasilitas radiasi di RS Adi Husada Surabaya. Dr. Indrayana

N, dr. MS., dan Mr. Donald Tunnard dari Intergen Co. yang membantu dalam pembelian *Apoptag[®] plus peroxidase In Situ Apoptosis Detection Kit*. Mrs. Emily Matheu dari Santa Cruz Biotechnology dan Mr. Carter Cliff dari Intergen yang membantu saya lewat e-mail saat saya menghadapi beberapa kesulitan dalam pewarnaan.

5. Prof. Dr. Sarmanu, drh., MS selaku pembimbing statistik dan penguji dalam penyusunan tesis ini.
6. Suami saya, Achmad Syafii, S.Sos., yang dengan sabar mendengarkan keluh kesah saya, yang senantiasa memberikan dorongan saat saya mulai jenuh dan senantiasa melakukan apapun yang bisa dilakukannya untuk membantu saya.
7. Kedua anak saya tercinta, Erfan dan Sasha. Tesis ini Ibu hadiahkan untuk kalian berdua. Kalilanolah pihak yang paling banyak harus berkorban demi pendidikan Ibu ini. Semoga Allah memberikan rahmadNya agar kalian menjadi manusia yang berguna bagi nusa, bangsa dan agama.
8. Kedua orang tua saya, Bpk. Muljadi dan Ibu Harmini yang telah membesarkan dan mendidik saya sampai membantu saya dalam menempuh pendidikan saya sekarang ini. Bapak dan ibu mertua saya, Bpk/ibu Marhaban yang menerima saya seperti anak sendiri sehingga saya dapat menyelesaikan bagian akhir penelitian ini dengan baik. Saudara saya, Mas Heru dan Mbak Dewi ikut sibuk dalam mendidik dan

- mengasuh anak saya, Mbak Eny, Rudi dan Sigit yang juga memberikan peran yang tidak kecil dalam penyelesaian pendidikan saya.
9. Rekan peserta didik program magister minat Patobiologi; Irene Ratri Dewi, dr., MKes., Gondo Mastutik, drh., Mkes., Riza Novierta Pesik, dr., MKes., serta Almunawir, dr., atas segala kerja sama yang baik selama dalam masa pendidikan.
 10. Semua rekan saya di Gramik, mbak Ina, mbak Tika, mbak Rini, mbak Lenny, mbak Bayu dan Mas Zuhdi. Rekan di Elektron Mikroskop mbak Tania dan mbak Endah yang saya sayangi. Saya tidak dapat menyelesaikan tesis ini tanpa bantuan serta kerja sama yang baik dari mereka semua. Khusus untuk sahabat karib saya, Kristanti Parisihni, drg., persahabatan ini membuat saya sanggup bertahan dari segala badai dan topan selama saya menempuh pendidikan ini.
 11. Kepada semua pihak yang tidak mungkin saya sebutkan satu persatu disini, yang telah memberikan bantuan dalam penelitian dan penyusunan tesis ini.

Akhirnya dengan segala kelebihan dan kekurangan yang ada dalam tesis ini, saya berharap semoga tesis ini dapat berguna bagi pengembangan ilmu maupun bagi yang membutuhkannya.

Surabaya, Januari 2002

Penulis

RINGKASAN

Penurunan sekresi saliva pada terapi radiasi sampai sekarang belum dapat ditangani. Kelainan tersebut dapat menimbulkan gangguan fungsi dan kerusakan struktur rongga mulut. Hal ini dapat mengganggu kesehatan umum penderita bahkan dapat menimbulkan kematian. Untuk memperoleh cara penanganan yang tepat, telah dilakukan berbagai penelitian yang bertujuan untuk mengungkap mekanisme penurunan sekresi saliva tersebut, namun demikian mekanisme penurunan sekresi saliva pada terapi radiasi sampai sekarang belum jelas.

Hipotesis disusun berdasarkan teori bahwa DNA adalah struktur subselektif yang paling peka terhadap radiasi dibanding struktur yang lain. Kerusakan DNA akibat radiasi ionisasi dapat merupakan dampak baik langsung maupun tidak langsung, yaitu melalui radikal bebas yang ditimbulkannya. Sel asinar kelenjar saliva banyak mengandung air yang sangat mudah mengalami radiolisis bila terkena radiasi ionisasi dan menghasilkan radikal bebas. Kerusakan DNA dapat memicu aktivasi dan stabilisasi p53. Hasil akhir aktivitas p53 adalah apoptosis dan *cell cycle arrest*. Aktivasi p53 akibat radiasi ionisasi cenderung memicu proses apoptosis sel. Terapi radiasi biasa diberikan dalam dosis kecil dan berulang tiap 24 jam sampai dosis total yang diperlukan terpenuhi. Bila pada 24 jam setelah paparan radiasi didapatkan peningkatan apoptosis maka kerusakan akan menjadi lebih parah lagi karena pada saat itu dilakukan paparan radiasi kembali. Akumulasi dari apoptosis pada sel asinar kelenjar saliva yang hebat dan tidak bisa dikompensasi akan menyebabkan penurunan sekresi saliva.

Dari hal tersebut maka penelitian ini dilakukan untuk membuktikan adanya peningkatan apoptosis dan ekspresi p53 pada sel asinar kelenjar saliva mencit pada 24 dan 48 jam setelah paparan radiasi ionisasi.

Penelitian dilakukan secara eksperimental dengan menggunakan mencit strain BALB/c jantan, dewasa sebagai hewan coba. Unit analisis adalah kelenjar parotis mencit tersebut. Radiasi yang digunakan sama dengan sumber radiasi untuk terapi keganasan yaitu sinar γ dengan dosis 50 rad. Satu kelompok dikorbankan 24 jam setelah radiasi dan kelompok yang lain dikorbankan 48 jam setelah radiasi. Kelompok kontrol dikorbankan pada saat yang bersamaan dengan kelompok perlakuan yang akan dibandingkan. Pemeriksaan ekspresi p53 menggunakan metode imunohistokimia sedangkan sel yang mengalami apoptosis diamati dengan metode TUNEL assay.

Hasil pengamatan dan penghitungan dianalisis dengan Manova, Anova dan LSD. Hasil analisis statistik menunjukkan adanya peningkatan yang bermakna pada apoptosis maupun ekspresi p53 pada kelompok perlakuan baik kelompok yang dikorbankan pada 24 ataupun 48 jam setelah radiasi dibandingkan kelompok kontrol ($p < 0,05$). Untuk membandingkan antara peningkatan pada 24 jam dengan 48 jam setelah paparan maka efek maturasi dihilangkan terlebih dahulu. Data yang analisis adalah data selisih yang didapat dari pengurangan data kelompok

perlakuan dengan kelompok kontrol. Analisis dilakukan dengan Manova dan Anova. Hasil analisis menunjukkan kualitas peningkatan apoptosis dan ekspresi p53 pada 48 jam setelah paparan lebih rendah dibandingkan dengan kualitas peningkatan pada 24 jam setelah paparan. Penurunan kualitas peningkatan pada apoptosis tampak lebih besar daripada penurunan kualitas peningkatan ekspresi p53. Hal tersebut dikarenakan kerja p53 dalam memicu apoptosis dipengaruhi oleh banyak produk gen yang lain.

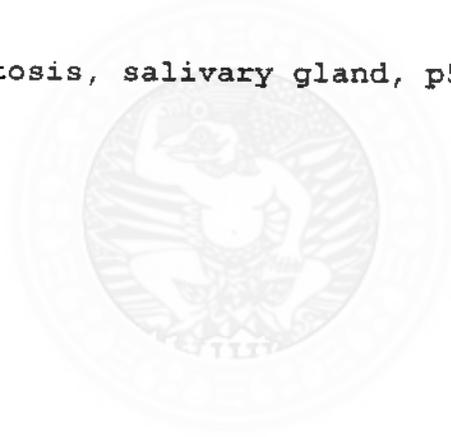
Berdasarkan hal tersebut diatas maka dapat dibuktikan bahwa terjadi peningkatan apoptosis dan ekspresi p53 pada sel asinar kelenjar saliva pada 24 jam dan 48 jam setelah paparan radiasi ionisasi. Peningkatan apoptosis merupakan faktor yang dapat dipercaya sebagai penyebab terjadinya xerostomia pada terapi radiasi.



ABSTRACT

PURPOSE: to investigate the effects of ionizing radiation to p53 expression and apoptosis of acini cells of mice salivary gland. **MATERIAL AND METHOD:** Male BALB/c mice were irradiated with 50 rad of γ ray. Irradiation was given to whole body. p53 and apoptosis were examined after 24 hour and 48 hour after exposure. As control groups, mice were irradiated with zero rad of γ ray and salivary glands were examined at same time. Examination of p53 was by immunohistochemistry and apoptosis was by TUNEL assay. **RESULTS:** Expression of p53 in treatment group, elevated 7 folds at 24 hours after exposure and 3 folds at 48 after exposure, in comparison with control groups. Cells undergo apoptosis in treatment group elevated 9 folds at 24 hours after exposure and decreased until 3 folds in comparison with control groups at 48 after exposure.

Key word: apoptosis, salivary gland, p53, and ionizing radiation



DAFTAR ISI

SAMPUL DALAM.....	i
PRASYARAT GELAR	ii
PERSETUJUAN.....	iii
PENETAPAN PANITIA	iv
UCAPAN TERIMA KASIH	v
RINGKASAN.....	viii
ABSTRAK	x
DAFTAR ISI.....	xi
DAFTAR GAMBAR.....	xiv
DAFTAR TABEL.....	xv
DAFTAR LAMPIRAN.....	xvi
DAFTAR ARTI LAMBANG, ISTILAH (I) DAN SINGKATAN (S).....	xvii
BAB 1. PENDAHULUAN	
1.1 Latar Belakang.....	1
1.2 Rumusan Masalah	4
1.3 Tujuan Penelitian	4
1.4 Manfaat Penelitian	5
BAB 2. TINJAUAN PUSTAKA	
2.1 Radiasi Ionisasi.....	6
2.2 Efek Biologis Radiasi Ionisasi	7
2.3. Saliva dan Kelenjar Saliva.....	9

2.4. Efek Klinis Terapi Radiasi terhadap Kelenjar saliva.....	11
2.5 Apoptosis.....	15
2.6 Protein 53 (p53).....	19
2.7 Efek Radiasi Ionisasi terhadap p53.....	24
2.8 Peran p53 pada Siklus Sel.....	29
2.9. Peran p53 terhadap Apoptosis.....	30
2.10 Deteksi sel Apoptosis.....	33
BAB 3 KERANGKA KONSEPTUAL DAN HIPOTESISI PENELITIAN	
3.1 Kerangka Konseptual	35
3.2 Hipotesis Penelitian	38
BAB 4 METODE PENELITIAN	
4.1 Rancangan penelitian	39
4.2 Populasi, sampel dan besar sampel	40
4.3 Variabel Penelitian	41
4.4 Unit Analisis	41
4.5 Instrumen Penelitian.....	42
4.6 Lokasi dan waktu penelitian	42
4.7 Prosedur Pelaksanaan Penelitian.....	42
4.8 Cara analisis data.....	45
4.9 Kerangka Operasional Penelitian.....	46
BAB 5 ANALISIS HASIL PENELITIAN	
5.1 Data Hasil Penelitian.....	47

5.2 Analisis Data Hasil Penelitian.....	52
BAB 6 PEMBAHASAN.....	57
BAB 7 KESIMPULAN	
7.1 Kesimpulan	65
7.2 Saran	65
DAFTAR PUSTAKA.....	66
LAMPIRAN.....	72



DAFTAR GAMBAR

Gambar 2.1 Mekanisme apoptosis pada <i>Caenorhabditis elegans</i>	17
Gambar 2.2 Apoptosis pada mamalia.....	18
Gambar 2.3 Skema mekanisme berhentinya siklus sel yang diperantarai p53.....	30
Gambar 2.4 Skema mekanisme apoptosis yang diperantarai p53.....	32
Gambar 5.1 Diagram batang rerata jumlah sel asinar kelenjar parotis mencit strain BALB/c yang mengalami apoptosis dan ekspresi p53.....	48
Gambar 5.2 Hasil pewarnaan ekspresi p53 dengan teknik imunohistokimia pada jaringan kelenjar parotis mencit strain BALB/c jantan yang terpapar radiasi 50 rad dan dikorbankan 24 jam setelah paparan radiasi.....	49
Gambar 5.3 Hasil pewarnaan ekspresi p53 dengan teknik imunohistokimia pada jaringan kelenjar parotis mencit strain BALB/c jantan yang terpapar radiasi 50 rad dan dikorbankan 48 jam setelah paparan radiasi.....	50
Gambar 5.4 Hasil pewarnaan ekspresi p53 pada potongan jaringan kelenjar parotis mencit strain BALB/c jantan yang tidak terpapar radiasi.....	50
Gambar 5.5 Hasil pewarnaan apoptosis dengan <i>TUNEL</i> assay pada kelenjar parotis mencit strain BALB/c jantan yang terpapar radiasi ionisasi dan dikorbankan 24 jam setelah radiasi.....	51
Gambar 5.6 Hasil pewarnaan apoptosis dengan <i>TUNEL</i> assay pada kelenjar parotis mencit strain BALB/c jantan yang terpapar radiasi ionisasi dan dikorbankan 48 jam setelah radiasi	51
Gambar 5.7 Hasil pewarnaan apoptosis dengan <i>TUNEL</i> assay pada kelenjar parotis mencit strain BALB/c jantan yang tidak terpapar radiasi ionisasi.....	52
Gambar 5.8 Grafik penurunan dampak radiasi pada 48 jam setelah paparan dibandingkan dengan 24 jam setelah paparan....	56

DAFTAR TABEL

Tabel 2.1 Perbedaan pokok nekrosis dan apoptosis.....	16
Tabel 5.1 Rerata jumlah sel asinar kelenjar parotis yang mengalami apoptosis dan mengandung p53 pada tiap 100 sel asinar.....	47
Tabel 5.2 Hasil uji LSD jumlah sel yang mengalami apoptosis dan jumlah sel yang mengandung p53 pada tiap 100 sel asinar...	53



DAFTAR LAMPIRAN

Lampiran 1. Penghitungan Besar Sampel.....	72
Lampiran 2. Bahan dan Instrumen Penelitian.....	73
Lampiran 3. Teknik Pemrosesan Jaringan dengan Teknik Rutin untuk <i>Pembuatan Parafin Embeded Tissue</i>	74
Lampiran 4. Dasar teknologi , Prinsip dan Prosedur Pemrosesan sediaan dengan S7101 Apoptag Plus Peroxidase in situ Apoptosis Detection Kit.....	77
Lampiran 5. Prosedur Pemeriksaan p53 dengan Kit Anti p53 Immunocruz Staining System dari Santa Cruz Biotechnology.....	83
Lampiran 6. Hasil Penghitungan Sel Asinar Kelenjar Parotis yang Mencit Strain BALB/c Jantan yang Mengalami Apoptosisper 100 sel	85
Lampiran 7. Hasil Penghitungan Ekspresi P53 pada sel Asinar Kelenjar Parotis Mencit Strain BALB/c Jantan.....	86
Lampiran 8. Hasil Uji Normalitas dan Homogenitas Data.....	87
Lampiran 9. Hasil Uji Manova dan Anova pada Kelompok Sampel	88
Lampiran 10. Hasil Uji LSD antar Kelompok Sampel.....	90
Lampiran 11. Hasil Uji Manova dan Anova pada Data Selisih Periakuan dan Kontrol.....	91



BAB 1

PENDAHULUAN

BAB 1

PENDAHULUAN

1.1 Latar Belakang

Penurunan sekresi saliva sampai sekarang masih merupakan efek samping terapi radiasi untuk kasus keganasan yang tidak bisa dielakkan. Penurunan sekresi saliva dikeluhkan penderita sebagai kekeringan pada rongga mulut (xerostomia). Penelitian yang telah dilakukan menunjukkan bahwa xerostomia merupakan keluhan sekitar 90% dari seluruh pasien dengan terapi radiasi kepala dan leher (Burket,1984 ; Spijkervet,1996 ; August,1996 ; Epstein,1999 ; Wu,2000). Penelitian terhadap aliran saliva pasien yang mendapat terapi radiasi untuk keganasan daerah kepala dan leher menunjukkan penurunan sekitar 50% (Epstein,1998 ; Eisbruch,1999). Dalam rangka mendapatkan cara penanganan yang tepat, berbagai penelitian telah dilakukan untuk mengungkap mekanisme penurunan sekresi saliva tersebut. Namun sampai sekarang mekanisme xerostomia pada terapi radiasi masih belum jelas.

Penurunan sekresi saliva (xerostomia) yang irreversible sebagai efek samping dari terapi radiasi menyebabkan berbagai kerusakan struktur rongga mulut dan meningkatkan intensitas rasa sakit. Beberapa penelitian menunjukkan adanya penurunan kualitas hidup pasien akibat xerostomia setelah radiasi (Carl,1995 ; August,1996 ; Epstein,1999). Saliva mempunyai berbagai macam peran dalam menjaga kesehatan rongga mulut. Peran tersebut antara lain, sebagai pelarut makanan, pembasah mukosa, peluncur dan pelumas pada proses penelanan, buffer

yang menjaga keasaman rongga mulut, perlindungan elemen gigi oleh protein saliva, sebagai enzim pada tahap awal pencernaan makanan, dan efek bakterostatik dan bakterisidal (Amerongen,1991 ; Provenza,1998). Xerostomia menyebabkan penurunan kesehatan rongga mulut yang parah. Berbagai kerusakan yang diakibatkan xerostomia adalah rasa sakit, sukar bicara, kesulitan dalam mengunyah dan menelan, kesulitan dalam menggunakan protesa, rasa tidak enak pada mulut pada malam hari, penimbunan lendir, rasa seperti terbakar pada mulut, gangguan pengecapan, kerusakan jaringan lunak, pergeseran keseimbangan mikroflora mulut, peningkatan karies yang terus berkelanjutan dan radang pada peridonsium (Amerongen, 1991). Apabila hal ini tidak mendapat perhatian akan mengakibatkan terganggunya fungsi pencernaan dan dapat memperburuk kesehatan umum dan bahkan dapat menjadi pemicu terjadinya kematian. Oleh karena itu perlu segera dicari mekanisme xerostomia tersebut sehingga didapatkan cara penanganan yang tepat bagi kelainan ini.

Beberapa pendapat tentang mekanisme xerostomia akibat terapi radiasi yang dikemukakan para ahli antara lain, apoptosis dan nekrosis sel asinar kelenjar saliva, penurunan fungsi sel yang meliputi perubahan *signal transduction* dan penurunan kapasitas sel asinar dalam mengikat air (Guchelaar,1997 ; Beer,1998 ; O'Connell,1999 ; Zeilstra,2000 ; Coppes,2000). Banyak literatur menyatakan bahwa apoptosis merupakan faktor yang diduga sangat berkaitan dengan kelainan tersebut. Peningkatan apoptosis pada jaringan sulit untuk diteliti karena perubahan

morfologis yang dapat dilihat hanya berjalan kurang dari satu jam dan proses apoptosis tidak memicu inflamasi (Hetts,1998). Usaha untuk mendapatkan mekanisme xerostomia pada terapi radiasi baru dimungkinkan bila diperoleh pemahaman yang lebih baik mengenai perubahan pada sel yang terpapar radiasi. Dapat dimengerti bahwa perubahan pada sel asinar kelenjar saliva sangat berpengaruh pada sekresi saliva.

Radiasi yang digunakan untuk terapi suatu keganasan adalah radiasi ionisasi. DNA adalah struktur subsel yang paling peka terhadap radiasi ionisasi (Bushong,1998 ; Kondo,1998 ; Wani,1999 ; Ross,1999 ; Aranda-Anzaldo,1999 ; Teyssier,1999), maka pada sel yang terpapar radiasi dapat terjadi kerusakan DNA sebelum kerusakan struktur subsel yang lain. Kerusakan DNA akan memicu aktivasi dan stabilisasi p53 (Di Leonardo,1994 ; Canman,1997 ; Kapoor,1998 ; Cotran,1999 ; Wang^b;1996). Hasil akhir kerja p53 adalah berhentinya siklus sel dan/atau apoptosis (Cotran,1999 ; Aranda-Anzaldo,1999 ; Bennett,1999). Perubahan ekspresi p53 dapat diamati dengan mudah dengan teknik imunohistokimia. Untuk melihat adanya peningkatan apoptosis digunakan metode *TUNEL assay*. Prinsip kerja metode ini adalah menyambung ujung 3'OH fragmen DNA yang sangat banyak ditemukan pada sel yang mengalami apoptosis (Hetts, 1998). Mengingat radiasi yang digunakan untuk terapi adalah radiasi fraksinasi yaitu radiasi dengan dosis kecil dan diberikan berulang tiap 24 jam, maka pada penelitian ini pengamatan apoptosis dan ekspresi p53 dilakukan pada 24 jam pertama dan kedua.

Dengan pendekatan patobiologis yang mengamati peningkatan ekspresi p53 dengan teknik imunohistokimia dan peningkatan apoptosis dengan metode *TUNEL assay*, pada sel asinar kelenjar parotis hewan coba yang diberi paparan radiasi, pada 24 jam dan 48 jam setelah paparan, diharapkan bisa membantu menjelaskan mekanisme xerostomia pada terapi radiasi.

1.2 Rumusan Masalah

1. Apakah terjadi peningkatan apoptosis dan ekspresi p53 pada 24 jam dan 48 jam setelah paparan radiasi ionisasi pada sel asinar kelenjar saliva?
2. Apakah terjadi penurunan kualitas peningkatan apoptosis dan ekspresi p53 pada 48 jam setelah paparan radiasi dibandingkan dengan 24 jam setelah paparan radiasi?

1.3 Tujuan

1.3.1 Tujuan Umum

Untuk mengungkap mekanisme xerostomia pada terapi radiasi.

1.3.2 Tujuan Khusus

1. Untuk membuktikan terjadi peningkatan apoptosis dan ekspresi p53 pada 24 jam dan 48 jam setelah paparan radiasi ionisasi pada sel asinar kelenjar saliva.
2. Untuk membuktikan terjadi penurunan kualitas peningkatan apoptosis dan ekspresi p53 pada 48 jam setelah paparan radiasi dibandingkan dengan 24 jam setelah paparan radiasi.

1.4 Manfaat Penelitian

Dari hasil penelitian ini diharapkan dapat diambil manfaat sebagai berikut:

1. Hasil penelitian dapat digunakan untuk memperbaiki penjelasan mengenai mekanisme penurunan sekresi saliva pada terapi radiasi.
2. Hasil penelitian dapat dijadikan dasar untuk penanganan penurunan sekresi saliva pada terapi radiasi.





BAB 2

TINJAUAN PUSTAKA

BAB 2

TINJAUAN PUSTAKA

2.1 Radiasi Ionisasi

Sampai saat ini terapi radiasi merupakan pilihan untuk perawatan kasus keganasan. Radiasi yang dipakai untuk terapi tersebut termasuk radiasi ionisasi. Radiasi yang sering dipakai adalah sinar x dan sinar γ . Radiasi ionisasi merupakan radiasi gelombang elektromagnetik dengan panjang gelombang pendek dan berfrekuensi tinggi. Sinar γ mempunyai panjang gelombang 0,0001 sampai dengan 0,01 nm dan frekwensi 10^{18} - 10^{20} (Constantinides, 1994 ; Cotran, 1999).

Akibat dari radiasi pada tingkat molekuler dan infrastruktur sel melibatkan banyak tahapan yang berturutan yang akhirnya menghasilkan beberapa lesi kimiawi yang menetap. Proses tersebut dimulai oleh transfer energi foton ke molekul sel. Absorpsi energi foton membuat molekul yang terlibat menjadi tidak stabil, menyebabkan kerusakan molekul yang permanen atau pelepasan elektron yang berenergi dan foton sekunder yang lebih lemah. Elektron yang terlepas dan foton sekunder berinteraksi dengan molekul sel yang lain, menyebabkan reaksi berantai yang menghamburkan energi foton asal dalam sel dan menghasilkan beraneka *short-lived ion* dan radikal bebas yang secara kimiawi tidak stabil. Ada beraneka ragam radikal bebas, tetapi yang paling banyak radikal yang terbentuk dari radiolisis air dan termasuk *hydroxyl radicals* (*OH), *hydrated electrons* (e_{aq}), *hydrogen atoms* (*H) dan *hydrogen peroxide* (H_2O_2). Radikal bebas ini sangat tidak stabil dan berinteraksi dengan molekul

disampingnya secara cepat dan langsung untuk membentuk lesi menetap secara kimiawi (Fuks dan Weichselbaum, 1995).

2.2 Efek Biologis Radiasi Ionisasi

Efek radiasi ionisasi yang terjadi karena kerja dari elektron, dapat menghasilkan suatu reaksi berantai yang melibatkan kerusakan ikatan molekul, perubahan jalur biokimiawi, transformasi sel dan efek pada jaringan dan tubuh yang dapat diamati.

Perubahan pada tingkat molekuler. Efek radiasi pada tingkat molekuler terjadi melalui efek langsung dan tidak langsung. Efek langsung terjadi pada atom dari target molekul. Target molekul ini biasanya sedikit tapi sangat penting bagi sel. Baik pada sel somatik maupun genetik, target molekul adalah *deoxyribonucleic acid* (DNA). Efek tidak langsung terjadi melalui pembentukan radikal bebas. Kebanyakan interaksi antara radiasi dan jaringan terjadi melalui radikal bebas yang terbentuk dari radiolisis air. Hal ini disebabkan air merupakan molekul yang paling banyak (60%) dalam tubuh. Jika interaksi dengan air hanya merupakan eksitasi elektron maka respons hanya berupa peningkatan suhu. Radikal bebas ini hanya berumur sekitar 0,001 detik tetapi mempunyai energi yang berlebihan, menyebar ke seluruh bagian dari sel dan merusak ikatan molekul. Efek tidak langsung yang lain dapat melalui interaksi radiasi dengan lipid, karbohidrat dan protein (Bushong, 1998).

Meskipun pada dasarnya setiap molekul dalam sel dapat rusak secara menetap oleh radiasi ionisasi, berbagai bukti telah menunjukkan

bahwa lesi yang bertanggung jawab terhadap kematian sel adalah lesi yang melibatkan struktur dan fungsi dari DNA. Banyak peneliti mengatakan bahwa DNA adalah target utama kerusakan tingkat sub selular yang disebabkan oleh radiasi (Wani,1999 ; Ross,1999 ; Aranda-Anzaldo,1999 ; Kondo, 1998 ; Teyssier,1999).

Efek radiasi pada tingkat sel. Seperti telah dijelaskan diatas, target molekul radiasi adalah DNA. DNA ada pada inti sel, maka inti sel lebih peka terhadap radiasi dibandingkan dengan sitoplasma. Sel akan mati jika inti diradiasi 100 rad, bila radiasi hanya mengenai sitoplasma maka dibutuhkan 1000 rad untuk membunuh sel (Bushong, 1998). Baik bila terjadi kerusakan DNA yang parah maupun bila kerusakan DNA tidak bisa diperbaiki maka sel akan mengalami apoptosis. Sel yang bertahan hidup dapat mengalami efek lanjutan berupa mutasi, kerusakan kromosom dan ketidakstabilan gen (Cotran, 1999).

Kerusakan pada kromosom adalah indikator yang baik dari adanya paparan radiasi. Kerusakan dibagi 2 tipe yaitu *single-hit* dan *multi-hit*. Delesi dan putusnya kromosom termasuk *single-hit*, sedangkan *dicentric*, *multicentric*, *ring chromosomes* dan translokasi resiprokal termasuk *multi-hit*. Kerusakan kromosom ini bisa merupakan efek segera dan efek lanjutan. Beberapa efek segera (*early effect*) radiasi adalah penurunan jumlah sperma, kelainan pada kromosom terjadi pada dosis minimum 10 rad, penurunan jumlah sel darah dapat terjadi pada dosis 25 rad dan eritema pada kulit dapat terjadi pada dosis minimum 200 rad. Efek

lanjutan dari radiasi dapat terjadi beberapa tahun setelah paparan radiasi dengan dosis yang sangat rendah (Bushong 1998).

Secara klinis, efek radiasi dapat berupa efek akut berupa nekrosis dan apoptosis, efek fibrosis dan karsinogenesis, tergantung besarnya paparan dan kepekaan jaringan. Nekrosis dapat terjadi pada dosis lebih dari 10 Gy (1000 rad), pada dosis 1-2 Gy (100-200 rad) terjadi kematian sel yang sedang berproliferasi (Cotran, 1999).

Efek radiasi tersebut dapat terjadi pada jaringan yang mengalami keganasan maupun jaringan sehat sekitarnya. Efek samping tersebut menjadi masalah besar dalam terapi radiasi yang semakin menuntut untuk dipecahkan dengan semakin tingginya tuntutan peningkatan kualitas hidup pasien. Maka banyak studi dilakukan bukan hanya untuk meningkatkan efektivitas terapi radiasi tetapi termasuk juga penanggulangan efek samping yang bisa *irreversible*.

2.3 Saliva dan Kelenjar Saliva

Kelenjar saliva berada pada jaringan sekitar rongga mulut. Sesuai dengan ukurannya, kelenjar saliva dapat digolongkan sebagai kelenjar saliva mayor dan minor. Kelenjar saliva mayor terdiri dari kelenjar parotis, kelenjar submandibular dan kelenjar sublingual sedangkan kelenjar saliva minor tersebar pada seluruh mukosa rongga mulut. Sekresi kelenjar saliva ada yang bersifat *serous*, *mucous* dan *seromucous*.

Dalam saliva terdapat berbagai macam bahan. *Whole saliva* adalah campuran dari sekresi kelenjar, ekskresi dan eksudat *sulcus gingiva* yang

didalamnya terdapat leukosit dan bakteri. Protein dan sel tertentu menyebabkan saliva terlihat tidak jernih dan kental. Saliva terdiri dari 99% air sedangkan sisanya terdiri dari bahan organik dan anorganik. Ph saliva berkisar antara 6,7 sampai 7,4 dan berat jenisnya 1.003 (Provenza,1988).

Produksi saliva normal berkisar antara 500-600 ml perhari. Bila sekresi saliva besarnya 20-90 ml/hari maka disebut hiposalivasi. Pada sekresi ludah kurang dari 0,06 ml/menit (= 3ml/jam) akan timbul keluhan mulut kering. Bila produksi kurang dari 20 ml/hari dan berlangsung dalam waktu yang lama, maka keadaan ini disebut xerostomia (Amerongen 1991).

Beberapa fungsi protektif saliva adalah (Provenza,1988) :

1. Lubrikasi dan pelembaban jaringan rongga mulut,
2. Lubrikasi dan pelembaban bagian dari mukosa jalan nafas,
3. Pembasahan dan persiapan makanan yang dikunyah untuk proses penelanan,
4. Menyingkirkan debris dari leher gigi dan daerah *interdental*,
5. Menyingkirkan dan atau melarutkan gula, jadi mencegah aksi dari bakteri kariogenik,
6. Bertindak sebagai *buffer* untuk menjaga lingkungan rongga mulut sehingga mengurangi kepekaannya terhadap karies dan pertumbuhan bakteri tertentu,
7. Merusak atau mencegah pertumbuhan mikroorganisme oleh immunoglobulin,

8. Menginduksi pembentukan *pellicle enamel* oleh protein pengikat kalsium,
9. Mencegah agregasi bakteri dengan imunoglobulin A
10. Rekalsifikasi enamel karena keberadaan konsentrasi berbagai ions yang tinggi.

2.4 Efek Klinis Terapi Radiasi terhadap Kelenjar Saliva

Berbagai komplikasi pada rongga mulut dapat terjadi pada terapi radiasi yang mengenai daerah kepala dan leher. Xerostomia adalah salah satu dari komplikasi *irreversibel* yang terbanyak ditemukan dan terbanyak dikeluarkan penderita. Penurunan sekresi saliva mencapai 90% setelah dosis total 40 Gy (Spijkervet,1996). Study retrospektif pada 35 pasien sebagai sample yang diambil secara random dari semua pasien yang mendapatkan terapi radiasi di *Departement of Radiation Oncology Massachusetts General Hospital* menunjukkan adanya xerostomia pada pasien dengan terapi radiasi (August, 1996). Hasil survey oleh Epstein dkk. 1999 pada pasien dengan terapi radiasi menunjukkan adanya 91,8% pasien yang mengeluh adanya kekeringan pada rongga mulut.

Produksi saliva *whole stimulated dan resting* menurun antara 36,67% sampai dengan 47,9% pada satu minggu setelah radiasi, dan kemudian tetap pada kadar tersebut pada minggu selanjutnya (Epstein,1998). Eisbruch dkk. 1999, melakukan pengukuran sekresi kelenjar parotis 88 pasien dengan terapi radiasi kepala dan leher. Hasil pengukuran tersebut menunjukkan bahwa terdapat ambang dosis radiasi,

bila ambang tersebut terlampaui maka kelenjar saliva akan sangat sedikit bahkan tidak memproduksi saliva dan tidak pulih dalam waktu yang sama. Ambang batas tersebut adalah 24 Gy untuk *unstimulated/resting* saliva dan 26 Gy untuk *stimulated saliva*.

Xerostomia akan menyebabkan berbagai kerusakan dalam rongga mulut antara lain : peningkatan karies gigi, peningkatan pembentukan plak gigi dan peradangan jaringan periodontal, infeksi, perubahan rasa pengecap dan penurunan berat badan. Selain itu adanya xerostomia juga meningkatkan intensitas rasa sakit akibat kerusakan yang lain, mukositis misalnya. Efek samping tersebut dapat mengganggu kualitas hidup pasien. Kelainan ini sampai sekarang tidak dapat disembuhkan. Terapi yang dilakukan hanya untuk mengurangi gejala yang timbul yaitu dengan bahan pelembab dan pengganti saliva (Beer,1998 ; Carl,1995)

Berbagai mekanisme telah diduga menyebabkan berkurangnya sekresi saliva pada terapi radiasi yang mengenai daerah kepala dan leher. Salah satu faktor yang sangat banyak diduga sebagai mekanisme kelainan adalah apoptosis sel asinar *serous* kelenjar saliva (Beer,1998). Namun penelitian yang dilakukan Paardekopper, 1998, pada kelenjar parotis dan sub mandibular tikus yang terpapar radiasi sampai dengan 25 Gy tidak menemukan peningkatan apoptosis yang bermakna. Hasil pengamatan menunjukkan bahwa terdapat kurang lebih 3% sel dengan *abberant nuclei* pada dosis 2 Gy pada 7,5 sampai dengan 24 jam setelah radiasi. Setengah dari sel *abberant nuclei* ini tampak sebagai sel apoptosis.

Penelitian lain yang berusaha untuk mengungkap mekanisme xerostomia pada terapi radiasi dilakukan pada tahun 2000, oleh Zeilstra. Penelitian dilakukan terhadap kelenjar submandibular tikus dengan paparan sinar-x dosis tunggal 15 Gy. Hasil pengamatan terhadap jumlah sel menunjukkan tidak ada pengurangan pada pengamatan kurang dari 30 hari setelah pemaparan. Hal tersebut menimbulkan pemikiran bahwa penurunan sekresi kelenjar saliva disebabkan oleh gangguan fungsi dari sel asinar.

Penelitian tersebut didukung oleh penelitian Coppes, 2000. Pada penelitian tersebut tidak didapatkan kerusakan sel asinar pada 6 hari setelah radiasi dan radiasi berpengaruh pada hantaran sinar yang secara berturut-turut menyebabkan penurunan respons. Di duga bahwa efek awal dari radiasi dalam waktu 3 hari adalah kerusakan membran yang melibatkan transfer signal dari reseptor G-protein.

Dugaan tersebut tidak sesuai dengan hasil penelitian dari O'Connel, 1999, yang menggunakan tikus sebagai model dengan paparan sinar gamma 10 Gy. Hasil pengamatan pada kelenjar sub mandibular menunjukkan tidak ada perbedaan pada fungsi sekresi (*muscarinic agonist-stimulated saliva flow, intracellular calcium mobilization, Na⁺, K⁺, 2Cl⁻ - co-transport activity*) sel asinar yang terpapar radiasi dan kontrol. Perubahan pada kelenjar submandibular meliputi penurunan sekresi saliva yang distimulasi oleh pilocarpin sebesar 67% pada 12 bulan setelah pemaparan. Hal ini sejalan dengan penurunan sampai dengan 47% pada berat basah kelenjar. Pengamatan histologis dan morfometrik

menunjukkan bahwa sel asinar menjadi lebih kecil dan menempati volume relatif lebih sedikit dan *convulated granular tubules* lebih kecil tetapi menempati volume yang relatif sama, sedangkan ukuran *intercalated duct* dan *striated duct* tetap, tetapi menempati volume yang lebih besar. Sebagai tambahan tidak ada inflamasi maupun fibrosis yang ditemukan pada sample. Mobilisasi ion Ca^{2+} yang distimulasi oleh *carbachol* maupun *thapsigargin* mirip pada kontrol maupun pada sample. Sedangkan Na^+ , K^+ , 2Cl^- co-transport activity tidak terdapat perbedaan yang nyata. Hal tersebut menunjukkan bahwa reaksi kelenjar saliva terhadap radiasi ionisasi bukan disebabkan karena inflamasi, fibrosis maupun perubahan mekanisme signal neurotransmitter. Respons tersebut kemungkinan disebabkan karena adanya perubahan jumlah sel atau kapasitas sel asinar dalam mengikat air.

Perubahan lain yang diamati adalah adanya peningkatan jumlah sel mast dan *hyaluronic acid* pada kelenjar saliva yang teradiasi sekali sehari selama lima hari dengan dosis total 20, 35 dan 45 Gy. Penelitian tersebut menggunakan kelenjar parotis dan kelenjar submandibular, sebagai kontrol dipakai kelenjar kontralateral. Pada hari ke 180 terdapat berkurangnya parenkim kelenjar yang sesuai dengan dosis. Perubahan ini berhubungan erat dengan peningkatan kepadatan sel mast dan *hyaluronic acid* yang meningkat sesuai dengan dosis radiasi (Henrikson, 1994)

2.5 Apoptosis

Apoptosis dikenal pertama kali pada tahun 1972 dan dipublikasikan oleh Kerr dkk. sebagai proses kematian sel secara terprogram. Apoptosis berasal dari kata dalam bahasa Yunani, yang berarti *falling off*. Apoptosis merupakan proses yang aktif yang dikendalikan sendiri oleh sel dan merupakan perjanjian untuk mati atau *commitment to die* sehingga tidak ada proses peradangan. Proses tersebut bertujuan untuk mengeliminasi sel yang tidak diperlukan melalui aktivasi kejadian serial yang terprogram secara internal dan dipengaruhi oleh sekumpulan produk gen. Apoptosis terjadi selama perkembangan, sebagai mekanisme homeostatik yang mengatur populasi sel dalam jaringan, sebagai mekanisme pertahanan, bila sel rusak oleh suatu penyakit atau bahan racun dan pada proses penuaan. Stimulus yang menjejaskan akan menyebabkan apoptosis bila ada dalam dosis yang relatif lebih kecil daripada yang menyebabkan nekrosis (Cotran, 1999).

Nekrosis terjadi pada jejas non fisiologis yang akut. Sel nekrotik membengkak dan lisis, mengeluarkan isi sitoplasma dan inti ke interseluler yang memicu terjadinya peradangan. Meskipun mekanisme ini penting dalam jejas akut dan respons peradangan tertentu yang parah, tetapi nekrosis bukan mekanisme dimana sel normal mati. Sampai dengan tahun 1970, nekrosis adalah satu-satunya tipe kematian sel yang secara jelas teridentifikasi. Hal ini membuat seolah-olah kematian sel adalah kejadian non fisiologis dan merusak.

Sel yang mengalami apoptosis secara cepat akan mengecil dan kehilangan kontak normalnya dengan jaringan interseluler dan secara kemudian menunjukkan kondensasi kromatin, fragmentasi inti, *cytoplasmic blebbing* dan fragmentasi sel menjadi *apoptotic bodies* kecil. *Apoptotic bodies* ini secara cepat difagositosis dan dicerna oleh sel sebelahnya atau makrofag. Oleh karena tidak ada isi sitoplasma yang dikeluarkan ke media interseluler selama apoptosis, maka inflamasi tidak dipicu. Penemuan apoptosis adalah prestasi yang luar biasa dari histologi karena dari satu buah slide yang mengandung jutaan sel hanya akan ditemukan beberapa

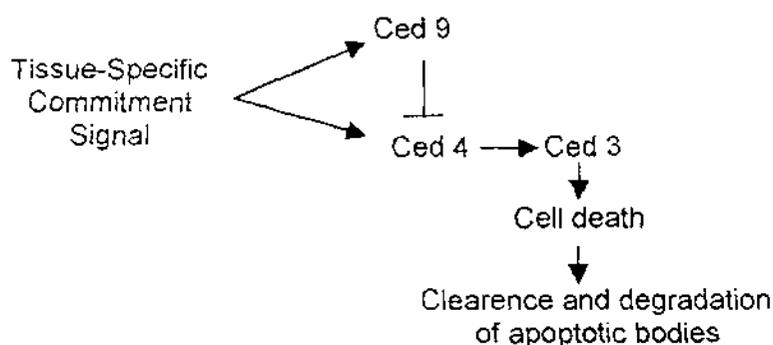
Tabel 2.1 Perbedaan pokok nekrosis dan apoptosis

Ciri-ciri	Nekrosis	Apoptosis
Stimuli	Toksin, hipoksia parah, jejas masif dan kehabisan ATP.	Kondisi fisiologis dan patologis tanpa kehabisan ATP.
Kebutuhan energi	Tidak ada.	Ada.
Histologi	Sel bengkak, organel rusak, kematian sebagian jaringan.	Kondensasi kromatin, <i>apoptotic bodies</i> , kematian sel tunggal.
Pola kerusakan DNA	Ukuran fragmen tidak teratur.	Fragmen tdd. kelipatan 185 pasang basa.
Membran plasma	Lisis	Utuh, membentuk tonjolan, perubahan molekuler
Fagositosis sel mati	Sel fagosit	Sel di dekatnya.
Reaksi jaringan	Keradangan	Tanpa peradangan

sel apoptosis. Hal ini disebabkan oleh perubahan morfologi apoptosis berjalan kurang dari satu jam (Hetts,1998 ; Thornberry & Lazebnik,1998). Perbedaan pokok antara nekrosis dan apoptosis secara garis besar dapat dilihat pada tabel 2.1

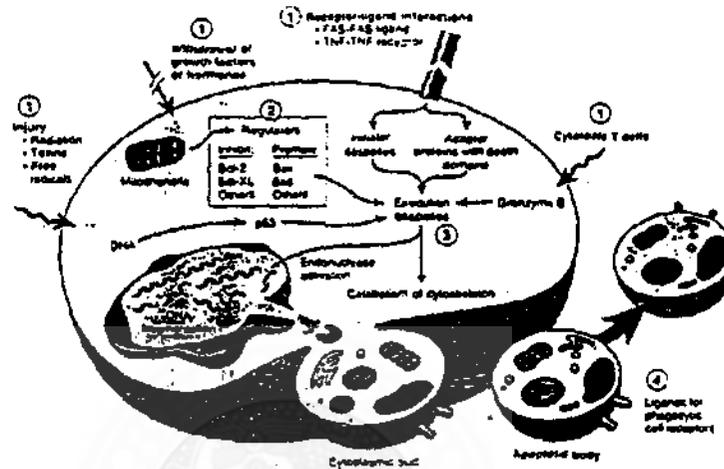
Mekanisme genetik dan molekuler dari apoptosis pertama kali ditemukan pada akhir tahun 1980-an dan awal tahun 1990 pada penelitian cacing nematoda *Caenorhabditis elegans*. Program kematian sel selama perkembangan *C. elegans* sangat tetap dan dapat diduga yaitu adanya beberapa gen khusus yang diaktivasi untuk mematikan 131 sel secara tepat dan meninggalkan 959 sel pada cacing dewasa. Apoptosis pada perkembangan dapat dikatakan sebagai kejadian yang normal seperti halnya yang terjadi pada deferensiasi akhir dari otot atau syaraf.

Dari hasil penelitian pada cacing tersebut didapatkan bahwa terdapat tiga gen yang mengatur apoptosis (disebut gen *ced* pada *C. elegans* untuk *cell death abnormal*). Pengaturan tersebut dikonversi dalam evolusi, dari cacing ke manusia (Hetts,1998). Proses apoptosis pada cacing dapat digambarkan sebagai berikut:



gambar 2.1 Mekanisme apoptosis pada *Caenorhabditis elegans*

Regulasi apoptosis pada manusia dan mamalia lebih kompleks dibandingkan dengan regulasi apoptosis pada cacing. Regulasi apoptosis pada manusia dan mamalia melibatkan banyak molekul signal terutama pada tahap awal dari *commitment* untuk apoptosis.



Gambar 2.2. Apoptosis pada mamalia

Proses apoptosis yang terdapat pada mamalia dapat dibagi dalam empat tahap yang saling tumpang tindih yaitu (1) *signaling pathways* yang menginisiasi apoptosis, (2) *Control and integration stage*. Dalam tahap ini beberapa molekul meregulasi baik positif maupun negatif dalam menstimuli, menghambat dan mencegah terjadinya apoptosis, jadi dalam tahap ini ditentukan hasil akhir. (3) *A common-execution phase*, ini adalah tahap dimana program kematian sel berjalan dan melibatkan protease *caspase*. (4) *Removal of dead cells* dengan oleh sel fagosit maupun oleh sel sehat didekatnya (Cotran, 1999).

(1) Signaling Pathway

Stimulus apoptosis dapat membentuk signal yang dihantarkan melewati membran plasma ke molekul intrasel atau langsung ke target

yang ada dalam sel. Signal transmembran dapat merupakan determinan apoptosis positif atau negatif. Sebagai contoh hormon tertentu, faktor pertumbuhan dan sitokin membangun *signal transduction cascade* yang menghambat program apoptosis yang ada. Tidak adanya faktor tersebut menyebabkan hilangnya hambatan apoptosis sehingga proses apoptosis dapat berjalan. Determinan positif yang keberadaannya memicu apoptosis yang penting adalah ligand yang dapat terikat pada kelompok *tumor necrosis factor receptor* (TNFR). Signal yang langsung berinteraksi dengan target didalam sel antara lain dibentuk oleh ikatan antara glukokortikoid dengan reseptor pada inti dan radiasi ionisasi yang merusak DNA (Cotran, 1999).

(2) *Control and Integration Stage.*

Tahap ini dilakukan oleh protein khusus yang menghubungkan antara signal apoptosis dengan program eksekusi. Protein ini penting karena kerjanya menentukan apakah signal apoptosis tersebut diteruskan atau tidak. Protein yang bekerja pada tahap ini dapat dibagi dua kelompok yaitu kelompok *protein adapter* dan kelompok protein Bcl-2, yang mempunyai peran lebih banyak dalam apoptosis dengan cara mengatur fungsi dari mitokondria (Cotran, 1999).

Signal apoptosis dapat mempengaruhi mitokondria dalam 2 jalur;

(1) Signal apoptosis dapat menghasilkan *mitochondrial permeability transition*. Pembentukan pori-pori pada membran dalam mitokondria akan menyebabkan penurunan membran potensial dan pembengkakan. (2) Signal juga meningkatkan permeabilitas membran luar mitokondria, dan

lepasnya *cytochrom-c* ke sitoplasma (Cotran,1999). *Cytochrom-c* akan berikatan dengan Apaf-1 menyebabkan tahap selanjutnya dari apoptosis (Green & John,1998).

(3) *The Execution Phase.*

Tahap ini dilakukan oleh kelompok protein caspase, suatu *cystein-protease* yang berada dalam sel. Istilah caspase didasarkan pada dua kemampuan katalisis yang dimiliki oleh enzim ini yaitu *c-* yang menunjukkan mekanisme *cystein protease* dan *aspase* menunjukkan adanya kemampuan yang unik untuk memecah residu asam aspartat.

Caspase dalam sel secara normal berbentuk proenzym yang tidak aktif. Caspase mempunyai aktivitas enzimatis dan memicu kerusakan sel bila mengalami proses proteolitik pada beberapa tempat spesifik. Caspase dapat diaktivasi melalui dua mekanisme yang berbeda. Pertama melalui pemaparan caspase yang lebih dulu teraktivase. Hal ini karena semua caspase mempunyai kekhususan pemotongan yang mirip sehingga membentuk "*caspase cascade*". Mekanisme ini digunakan secara luas oleh sel untuk mengaktivasi efektor caspase yang terakhir: caspase-3, caspase-6 dan caspase-7. Mekanisme kedua ditemukan pertamakali pada caspase-8, *initiator caspase* yang bekerja *downstream* dari *Fas/CD95 death receptor*. Ikatan antara fas-fasligand akan menyebabkan agregasi dari *death domain (DD)* dan kemudian mengikat FADD. FADD mempunyai *death effector domain* yang dapat mengaktivasi caspase-8 (Hengartner, 1998 ; Ashkenaszi & Dixit,1998).

Caspase ini selanjutnya akan menyebabkan sel mengalami perubahan morfologis apoptosis. Peran caspase dalam proses ini belum sepenuhnya diketahui. Hal ini dikarenakan banyaknya substrat yang ditemukan. Ada 40 lebih substrat yang telah diidentifikasi, tetapi hanya sedikit yang cara kerjanya telah diketahui. Salah satu peran caspase adalah menginaktivasi protein yang melindungi sel dari apoptosis. Contohnya dari hal ini adalah pemotongan ICAD/DFF45, suatu inhibitor nuclease yang bertanggung jawab terhadap fragmentasi DNA, CAD (*caspase-activated deoxyribonuclease*). Pada sel yang tidak mengalami apoptosis CAD berikatan dengan ICAD. Selama apoptosis, caspase menginaktivasi ICAD sehingga CAD menjadi aktif. Kendati demikian bila CAD disintesis pada saat ICAD tidak ada, CAD tersebut tidak akan aktif (Thornberry & Lazebnik, 1998). Fragmen DNA yang dihasilkan oleh CAD ini mempunyai ukuran sebesar 50–300 kilobasa. Fragmentasi DNA ini dilanjutkan oleh Ca^{2+} dan Mg^{2+} *dependent endonuclease* menjadi 180-200 pasangan basa (Cotran, 1999). Contoh lain dari inhibitor apoptosis yang dirusak oleh caspase adalah protein Bcl-2, caspase bukan hanya menginaktivasi Bcl-2 tetapi juga membentuk fragmen yang memicu terjadinya apoptosis (Thornberry & Lazebnik, 1998).

Perubahan lainnya yang ditimbulkan oleh aktivasi caspase adalah pemotongan protein *cytoskeletal* dan kantung inti. Selain itu terjadi ikatan silang protein yang disebabkan karena aktivasi dari *transglutaminase*. Kedua hal tersebut menyebabkan protein sitoplasma mengerut terikat

dan memadat dan dapat pecah dan membentuk *apoptotic bodies* (Cotran,1999).

(4) *Removal of dead cell.*

Proses fagositosis dan degradasi *apoptotic bodies* belum diketahui dengan jelas dibandingkan dengan proses sebelumnya. Perubahan pada membran protein (peningkatan thrombospondin) dan lemak (adanya *phosphatidylserine*) menyebabkan *apoptotic bodies* dikenali oleh sel lain untuk difagositosis. Proses degradasi akhir dari *apoptotic bodies* belum diketahui. Kelainan dari proses ini pada manusia terkait dengan beberapa bentuk dari *systemic lupus erythematosus*, yaitu kelainan pemrosesan *apoptotic bodies* menyebabkan pembentukan *antinuclear antibody* (Hetts,1998)

2.6 Protein 53 (p53)

Protein 53 (p53) ditemukan sebagai protein pada inti sel yang terikat oleh large T (tumor) antigen dari transforming virus SV 40. Hal yang telah jelas diketahui adalah bahwa mutasi gen tersebut dapat menyebabkan pertumbuhan neoplasia (Sirica,1996 ; Costantinides,1994 ; Cotran,1999). Gen *p53*, yang memproduksi protein 53 (p53), dalam keadaan normal berperan sebagai *tumor supressor gene* yang menghambat proliferasi sel. Pada manusia gen p53 terletak dalam 20 kb DNA yang terdapat pada kromosom 17p13.1. Gen ini terdiri dari 11 exon yang memproduksi 2,2 sampai 2,5-kb mRNA dan terdapat hampir pada semua sel dan jaringan tubuh. Exon pertama 213 basa adalah basa

noncoding dan membentuk mRNA yang tidak ditranslasikan. Kadar tertinggi mRNA p53 terdapat pada thymus dan limpa dan lebih rendah pada organ lain (Levine, 1995).

Gen *p53* adalah gen yang dominan, fungsi gen akan terganggu hanya bila kedua alel mengalami kerusakan. Fungsi *p53* sebagai *tumor suppressor gene* tampak nyata pada kasus *Li-Fraumeni Syndrome*. Pada kasus tersebut terdapat kehilangan gen *p53* yang diturunkan. Pada keluarga tersebut terdapat peningkatan resiko menderita kanker terutama sarkoma, kanker payudara, leukemia, tumor otak dan karsinoma kortek adrenal (Cotran, 1999 ; Costantinides, 1994).

Protein 53 (p53) terdiri dari 393 residu asam amino pada manusia dan ditemukan sebagai fosfoprotein inti. Berdasarkan urutan asam amino, protein ini terdiri dari 3 domain atau unit fungsional yaitu : domain 1. Terdiri dari residu asam amino ke 1 sampai 75 atau 80. Domain ini disebut *N-terminal transactivation domain*. Domain ini sangat asam dan beberapa residu serine adalah tempat bagi fosforilasi. Domain kedua (*DNA binding domain*), berada antara residu ke 129 sampai 290, bertanggung jawab terhadap ikatan p53 pada urutan DNA yang khusus untuk p53. Domain ini bekerja sama dengan *N-terminal domain* untuk memicu transkripsi gen yang mempunyai *DNA binding site* untuk p53. Domai ke-3 adalah *carboxy-terminal domain*, terdiri dari residu ke 276 sampai 390 pada mencit dan 319 sampai 393 pada manusia (Levine, 1995 ; Burns & El-Deiry, 1999).

Protein 53 (p53) yang teraktivasi akan mengikat DNA dan menstimuli transkripsi beberapa gen yang terkait pada kedua efek dari

p53 yaitu *cell cycle arrest* dan apoptosis (Di Leonardo,1994 ; Cotran,1999 ; Aranda-Anzaldo,1999 ; Bennett,1999). Peningkatan aktivitas p53 terjadi melalui fosforilasi pada banyak regio oleh beberapa kinase seperti *DNA-dependent protein kinase*, *protein kinase C (PKC)*, *mitogen-activated protein kinase*, *Casein Kinase (CK I)* dan CKII (Kapoor & Lozano,1998).

Kerusakan DNA memicu banyak modifikasi *post-translasi*, antara lain fosforilasi residu serine 6, 9, 15, 20, 33, 37, dan 392, defosforilasi serine-3776 dan acetilasi residu lisine 320,373 dan 382 (Chebab, 1999).

2.7 Efek Radiasi Ionisasi terhadap p53

Radiasi ionisasi telah diketahui dapat meningkatkan aktivasi dan stabilisasi p53. Aktivasi dan stabilisasi ini disebabkan oleh fosforilasi p53 maupun MDM2, yang merupakan inhibitor p53 (Evan & Littlewood,1998). Radiasi sinar-x dengan dosis rendah dapat meningkatkan aktivitas p53 pada tikus dan mencit. Ekspresi p53 pada beberapa organ tikus yang diradiasi dengan dosis rendah (10 rad, 25 rad atau 50 rad) meningkat 2 sampai 3 kali lipat dibandingkan dengan kadar p53 basal pada tikus yang tidak diradiasi. Demikian juga pada mencit, akumulasi p53 meningkat secara signifikan pada 24 jam setelah radiasi. Peningkatan tersebut pada kedua binatang coba berbeda dari organ satu dengan organ yang lain (Wang, 1996^a ; Wang,1996^b)

Telah diketahui bahwa DNA adalah target utama kerusakan tingkat sub selular yang disebabkan oleh radiasi (Bushong,1998 ; Kondo,1998; Wani,1999 ; Ross,1999 ; Aranda-Anzaldo,1999 ; Teyssier,1999). Lesi

pada DNA antara lain berupa ikatan silang protein DNA, ikatan silang pita DNA, oksidasi dan degradasi dari basa DNA, ikatan gula-phosphat terputus dan pita DNA tunggal maupun ganda terputus (Cotran,1999). Sebagian besar kerusakan tersebut disebabkan oleh radikal bebas yang ditimbulkan oleh radiolisis air, jadi oleh efek tidak langsung.

Radikal bebas yang paling penting menimbulkan kerusakan adalah radikal hidroksil (*OH) (Wallace,1998). Kerusakan DNA akan memicu mekanisme *repair* dan jalur *signal transduction* yang menyebabkan siklus sel berhenti atau diprogram untuk mati sel (apoptosis). Mekanisme repair kerusakan DNA oleh sinar x tampaknya berbeda dengan *nucleotide excision repair* yang terjadi setelah pemaparan UV. Hal ini tampak pada penyakit *xeroderma pigmentosum* dimana mekanisme *repair* DNA yang rusak karena UV menurun tetapi *repair* kerusakan DNA yang disebabkan sinar x berjalan normal (Fuks,1995).

Respons ini diperantarai oleh stabilisasi dan aktivasi protein p53, faktor transkripsi yang dikode oleh *tumor suppressor gene* yang mengatur pertautan penting dari jalur ini (Di Leonardo,1994 ; Wang,1996 ; Canman & Kastan,1997 ; Kapoor & Lozano,1998 ; Burns & El-Deiry,1999 ; Cotran,1999). Aktivasi p53 menyebabkan protein ini dapat mempunyai kemampuan untuk memicu atau menekan gen yang mempunyai *binding site* untuk p53 dan stabilisasi p53 menyebabkan p53 lebih sulit didegradasi oleh ubiquitin.

Stabilisasi p53 menyebabkan waktu paruh p53 meningkat. Protein 53 (p53) yang aktif pada sel normal mempunyai waktu paruh yang sangat

pendek yaitu 20 – 30 menit. Stabilisasi p53 tampak pada sel yang terpapar ultra violet, waktu paruh p53 meningkat sampai dengan 150 menit (Agarwal, 1998 ; Burns,1999 ; Cotran,1999)

Stabilisasi dan aktivasi p53 ini berhubungan dengan modifikasi pascatranslasi protein ini. Modifikasi tersebut adalah fosforilasi, defosforilasi dan asetilasi dari bermacam residu. Peningkatan kecepatan transkripsi gen p53 tidak dapat meningkatkan aktivitas p53 secara bermakna (Khosravi, 1999 ; Moshe 1999).

Salah satu jalur fosforilasi yang tampaknya sangat berhubungan dengan kerusakan DNA akibat radiasi ionisasi adalah melalui jalur yang diperantarai protein ATM (*ataxia telangiectasia mutant*). Hal ini berdasar pada kenyataan bahwa karena mutasi dari gen ini menyebabkan hilangnya mekanisme *repair* DNA sel yang terpapar radiasi ionisasi sehingga penderita peka terhadap radiasi ionisasi tetapi respons terhadap kerusakan DNA akibat sinar UV berjalan normal. Hal tersebut memberikan kesan bahwa ATM berperan khusus pada kerusakan DNA akibat radiasi ionisasi (Yarnold,1997 ; Canman & Kastan,1998 ; Rotman & Shiloh,1999 ; Khosravi,1999 ; Suzuki,1999 ; Yan,2000).

Mutasi gen ATM secara keseluruhan menyebabkan penyakit *pleotropic ressesive ataxia telangiectasia* yang mempunyai *gejala neurodegeneration, immunodeficiency, genome instability, cancer predisposition*, peka terhadap radiasi ionisasi dan kelainan pada aktivasi *cell cycle chekpoint* bila terdapat kerusakan DNA (Khanna, 1998; Khosravi, 1999).

Protein ATM termasuk kelompok protein kinase yang mempunyai kemiripan dengan domain katalisis *phosphotidyl inositol-3-kinase* pada *carboxyl-terminal region*-nya. Protein ini terlibat dalam pengaturan siklus sel, *meiotic recombination*, monitoring panjang telomere dan respons terhadap kerusakan DNA. Penelitian dengan *ATM-deficient mice* telah menunjukkan bahwa ATM adalah regulator kunci dari *multiple signaling cascade* sebagai respons terhadap kerusakan pita DNA yang disebabkan oleh berbagai bahan perusak maupun proses yang normal (Rotman & Shiloh, 1998 ; Shaftman, 1997). Protein ini berada dalam baik dalam inti sel maupun dalam sitoplasma dan membran sesuai dengan fungsinya dalam pengenalan kerusakan DNA maupun penghantar signal (Yan, 2000).

Kerusakan DNA karena radiasi ionisasi yang paling berperan dalam peningkatan aktivitas p53 adalah *double strand break (dbs)*. Rotman dan Shiloh 1999, mengemukakan bahwa *dbs* tampaknya merupakan signal yang predominan untuk aktivasi jalur yang diperantarai oleh ATM. Penelitian yang dilakukan oleh Suzuki ,1999 membuktikan bahwa ATM berhubungan dengan kerusakan *dbs* DNA akibat radiasi ionisasi tetapi tidak berhubungan dengan kerusakan DNA yang disebabkan oleh UV maupun kerusakan akibat radiasi ionisasi yang berbentuk *single strand break*.

ATM mengaktivasi p53 dengan dua cara. Cara langsung dengan memicu terjadinya fosforilasi protein p53 pada urutan asam amino serine-15. Cara tidak langsung adalah melalui jalan menurunkan aktivitas (memfosforilasi) MDM2, inhibitor dari p53 (Canman & Kastan, 1998).

Fosforilasi pada serine-15 berperan penting dalam peningkatan kemampuan p53 dalam memicu terjadinya apoptosis (Chehab, 1999).

Fosforilasi MDM2 oleh ATM menyebabkan protein ini tidak dapat mengikat p53 sehingga tidak dapat menurunkan stabilitas dan aktivitas p53. Aktivitas p53 dapat dimodulasi oleh modifikasi MDM2. MDM2 mengikat *terminal amino* (ujung N) dari p53, menekan aktivitas transaktivasi p53 dan menyebabkan degradasi p53 yang diperantarai oleh proteosome. MDM2, baik regio amino (*N terminal transactivation domain*) maupun *carboxyl-terminal*, mampu menyebabkan destabilisasi p53 dan mengeluarkannya dari inti. Fungsi dari MDM2 adalah sebagai E3 *ubiquitin-protein ligase* dalam degradasi p53 oleh *ubiquitin-dependent proteolysis* dalam sitoplasma. Gen *mdm2* diregulasi secara positif oleh p53, sehingga membentuk sebuah lingkaran umpan balik. Fosforilasi MDM2 ini tidak tergantung aktivitas p53 maupun DNA-PK. Hal ini tidak terjadi pada sel yang dipapar dengan sinar ultra violet. Secara *in vitro* dibuktikan bahwa MDM2 secara langsung difosforilasi oleh ATM dan hal ini merupakan penyebab utama stabilisasi p53 (Khosravi,1999 ; Chehab,1999)

Fosforilasi p53 pada serine-15 ini tampaknya tidak secara langsung dapat meningkatkan stabilisasi p53. Secara invitro dibuktikan bahwa fosforilasi serine-20 yang berperan dalam stabilisasi p53. ATM dan ATR tidak dapat memicu fosforilasi pada asam amino ini. Kemungkinan ATM dan ATR memicu fosforilasi ser-20 dengan jalan memfosforilasi protein kinase yang lain (Chehab,1999).

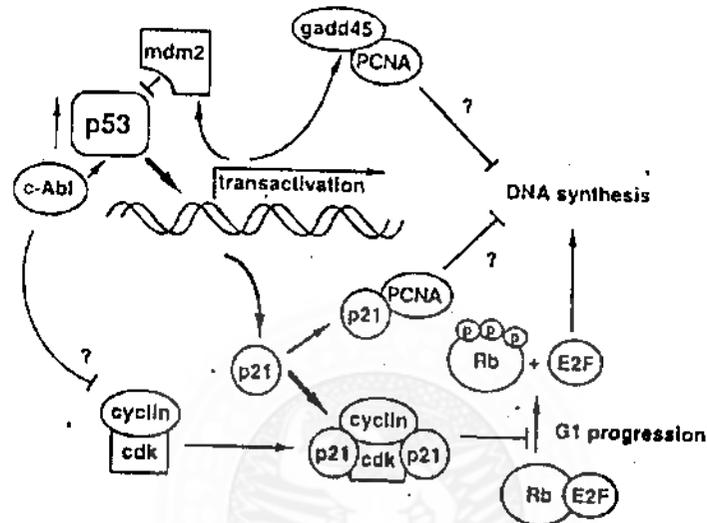
Protein kinase yang lain yang berperan dalam fosforilasi p53 adalah *DNA-dependent protein kinase* (DNA-PK) yang sub unit katalitiknya mirip dengan ATM. Beberapa literatur menyebutkan protein ini berperan dalam respons terhadap kerusakan DNA akibat radiasi ionisasi meskipun dalam peran yang lebih kecil (Jongmans,1996 ; Agarwal,1998 ; Teyssier,1999)

2.8 Peran p53 terhadap Siklus Sel

Protein53 (p53) menyebabkan berhentinya siklus sel dengan memicu transkripsi gen *ras*, yang memproduksi p21. Protein 21 (p21) adalah *protein transducer* bagi transkripsi gen dan menyebabkan siklus sel berhenti. Protein tersebut berperan sebagai *inhibitor cyclin dependent kinase* yang bekerja secara universal, dapat menghambat tiap tahap siklus sel terutama pada fase G1/S (gambar 1). Bagaimana mekanisme p21 dapat menghambat CDK masih belum diketahui. Hambatan pada CDK akan menurunkan aktivitas cyclin-CDK kompleks yang menyebabkan hambatan fosforilasi pRb yang diperlukan sel untuk masuk dalam fase S (Sirica,1996 ; Costantinides,1994 ; Cotran,1999)

Gen lain yang transkripsinya dipicu oleh p53 adalah gen *gadd45*. Hasil transkripsi gen *gadd45* akan menghambat sel masuk fase S dengan jalan mengikat PCNA (faktor tambahan untuk replikasi DNA). Selain oleh *gadd45*, PCNA juga dapat diikat oleh p21. Peningkatan aktivitas p53 akan menimbulkan mekanisme umpan balik yaitu dengan memicu transkripsi gen *mdm2*. MDM2 akan menghambat kerja dan mendegradasi p53 (Canman & Kastan,1997). Aktivitas transkripsi p53 dapat distimulasi oleh suatu tirosin kinase inti, c-Abl. Aktivitas c-Abl dipicu oleh kerusakan DNA

dengan perantaran protein ATM (Shaftman,1997). Mekanisme p53 memicu berhentinya siklus sel dapat dilihat pada gambar 2.3.



Gambar 2.3 Skema mekanisme berhentinya siklus sel yang diperantarai oleh p53. p53 memicu transkripsi dari gen *gadd45* dan gen *p21*. *gadd45* akan menghambat PCNA, sementara *p21* menghambat PCNA dan cyclin-CDK kompleks. Hambatan pada PCNA langsung menghentikan sintesis DNA. Hambatan pada cyclin-CDK kompleks akan menyebabkan hambatan fosforilasi pRb yang merupakan inhibitor E2F. E2F merupakan faktor transkripsi pada fase S. Aktivitas transkripsi p53 dapat distimulasi oleh suatu tirosin kinase inti, c-Abl. Aktivitas c-Abl juga dipicu oleh kerusakan DNA.

2.9 Peran p53 pada Apoptosis

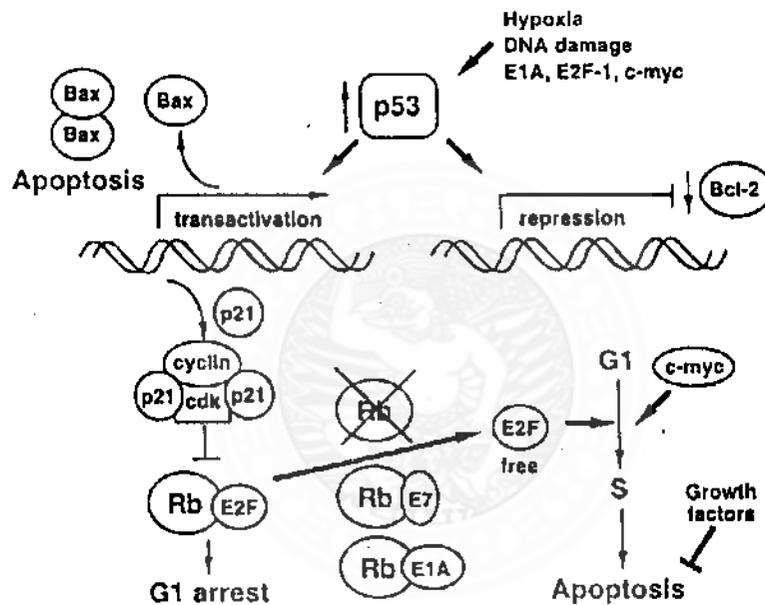
Apoptosis merupakan proses yang aktif yang dikendalikan sendiri oleh sel. Proses tersebut bertujuan untuk mengeliminasi sel yang tidak diperlukan melalui aktivasi kejadian serial yang terprogram secara internal dan dipengaruhi oleh sekumpulan produk gen (Cotran,1999). Seperti yang telah disebutkan diatas, melalui jalur ATM, p53 terfosforilasi secara

secara langsung pada urutan asam amino serine-5 maupun secara tidak langsung oleh peningkatan fosforilasi MDM2. p53 yang terfosforilasi pada ser-15 mempunyai kemampuan memicu apoptosis yang tinggi. Protein ini kemudian memicu transkripsi gen bax. Peningkatan ekspresi Bax oleh p53 ditunjukkan oleh hasil beberapa penelitian dengan transfer gen adenovirus p53 pada sel kanker paru dan ovarium (Choi,2000 ; Pearson,2000 ; Kagawa,2000 ; Jones,1998). Bax terbukti mempunyai peran penting dalam proses *p53-dependent apoptosis* pada kemoterapi. Defisiensi Bax mengakibatkan sel resisten terhadap kemoterapi dan transformasi keganasan dibanding dengan kontrol yang diberi perlakuan yang sama (McCurrach,1997).

Bax akan membentuk homodimer dan dapat memicu pelepasan *cytochrom-c*. Pelepasan *cytochrom-c* terutama disebabkan oleh pembukaan *mitochondrial permeability transition pore* (PTP) yang terjadi akibat integrasi bax dan oligomerisasi membran luar mitokondria (Eskes,2000 ; Skulachev,1998 ; Evan & Littlewood,1998). *Cytochrom-c* akan berikatan dengan Apaf-1 menyebabkan aktivasi caspase (Green & John, 1998).

Transkripsi gen lain yang berkaitan dengan apoptosis yang dipengaruhi oleh p53 adalah gen *Bcl2* (inhibitor Bax) dan p21. p53 menyebabkan hambatan transkripsi dan aktivasi bcl2. Bcl2 dapat berikatan dan membentuk heterodimer dengan Bax sehingga aktivitas Bax terhambat. Peningkatan transkripsi p21 akan meningkatkan apoptosis bila pRb. pRb dapat inaktif bila ada infeksi virus. E2F-1 yang bebas membuat

sel menjadi sensitif terhadap apoptosis yang diperantarai oleh p53 (Canman & Kastan 1997). Skema mekanisme apoptosis yang diperantarai p53 dapat dilihat pada gambar 2.4.



Gambar 2.4. Skema mekanisme apoptosis yang diperantarai p53. Efek p53 adalah memicu transkripsi dan aktivasi dari gen *Bax* dan menekan transkripsi gen *Bcl2*. *Bax* dapat mempromosi terjadinya apoptosis bila kadarnya melebihi *Bcl2* sehingga dapat membentuk *Bax* homodimer. *Bcl2* menghambat apoptosis dengan jalan berikatan dan membentuk heterodimer dengan *Bax*. Aktivitas lain dari p53 yang berkaitan dengan apoptosis adalah memicu transkripsi dari gen *p21*, seperti efek p53 pada siklus sel. *p21* menyebabkan hambatan pada kompleks cyclin-CDK dan menyebabkan pRb mengikat E2F. Bila pRb inaktif karena adanya virus maka E2F-1 membuat sel menjadi sensitif terhadap apoptosis yang diperantarai oleh p53.

Selain fenomena tersebut diatas, Sheard 1997 mengamati bahwa radiasi ionisasi bahkan pada dosis yang rendah pada sel kanker payudara akan menyebabkan peningkatan aktivitas p53 yang diikuti oleh peningkatan Fas (CD95). Fas adalah protein permukaan sel yang termasuk kelompok reseptor *tumor-necrosis factor*. Signal yang melalui Fas dapat memicu sel untuk apoptosis pada sel yang peka. Kadar p53 ditemukan meningkat pada 3 hari setelah radiasi dan diikuti oleh peningkatan Fas antara 4 sampai 8 hari setelah radiasi. Penemuan ini menunjukkan adanya hubungan yang langsung antara aktivitas p53 dengan peningkatan Fas setelah pemaparan dengan radiasi ionisasi dan pada dosis rendah radiasi ionisasi dapat memodulasi ekspresi Fas. Hasil penelitian ini sesuai dengan hasil yang ditemukan oleh beberapa peneliti yang lain, namun Fas/APO1 ini tampaknya tidak berperan dalam *p53-dependent apoptosis* sebagai respons dari kerusakan DNA (Burns & El-Deiry, 1999)

2.10 Deteksi sel apoptosis

Sel yang mengalami apoptosis, dengan pengecatan hematoxilin eosin akan tampak sebagai masa yang oval atau bulat dengan sitoplasma eosinofilik dan kromatin yang padat dan terfragmentasi. Perubahan morfologis sel yang mengalami apoptosis sangat sulit ditemukan karena perubahan yang tampak hanya berlangsung kurang dari satu jam sebelum sel tersebut didegradasi. Kematian sel karena apoptosis terjadi sel yang tunggal atau kelompok kecil, berbeda dengan nekrosis yang merupakan

kematian sebagian jaringan. Selain itu apoptosis tidak memicu inflamasi seperti halnya nekrosis. Pada jaringan yang mengalami regresi sebanyak 25% tiap hari dapat hanya ditemukan sel apoptosis 2-3% (Burch, 1990).

Oleh karena itu berbagai metode telah dikembangkan untuk mendeteksi apoptosis. Salah satu metode berdasar pada fragmentasi DNA yang mempunyai besar kelipatan dari 180-200 pasang basa. Dengan agarose gel electrophoresis dari ekstraksi DNA dapat dideteksi adanya fragmen DNA tersebut.

Metode lain untuk memeriksa apoptosis melalui fragmen DNA adalah dengan menggunakan *Tunel assay* (*terminal deoxyuridine nucleotide end labeling assay*). Fragmen DNA dideteksi dengan pelabelan secara enzimatik dari ujung 3'OH dengan rangkaian nukleotida. Ujung fragmen DNA ini banyak ditemukan pada inti sel yang mengalami apoptosis dan *apoptotic bodies*. *Tunel assay* dapat mendeteksi stadium awal dari apoptosis karena fragmentasi DNA terjadi sebelum perubahan morfologis tampak pada sediaan histologis (Hets, 1998).

Selain melalui fragmen DNA, perubahan pada membran sel yang mengalami apoptosis dapat dijadikan petanda yang dapat diamati. Sayangnya teknik pengamatan dengan metode ini yang tersedia hanya dengan label *fluorescent* dimana sel yang positif akan berfluoresensi. Metode tersebut relatif sulit dilakukan selain memerlukan mikroskop fluoresensi, pengamatan harus dilakukan dalam 24 jam dan sel negatif tidak tercatat dan hasil pengamatan tidak dapat diambil dalam persentase, sehingga data sulit untuk dianalisis.

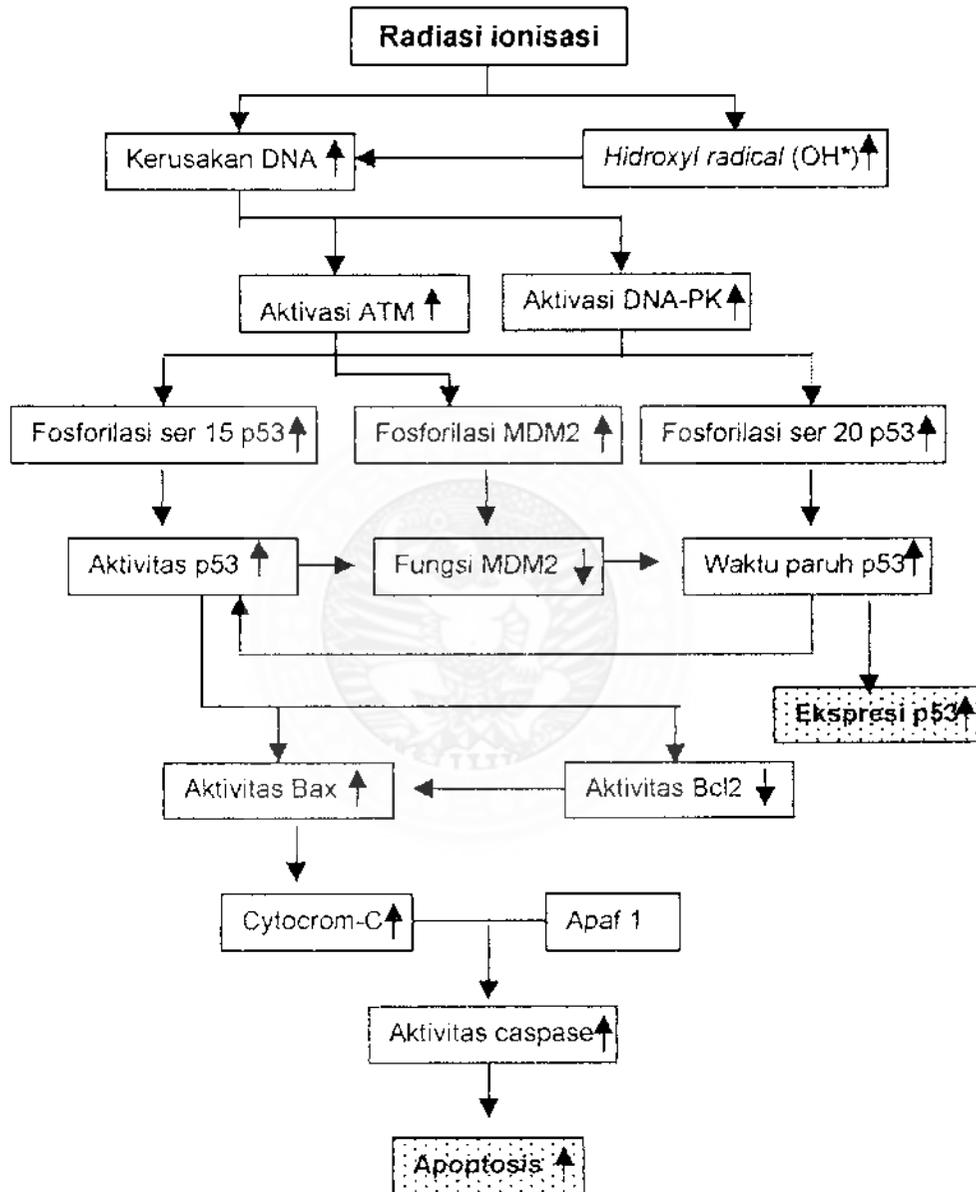


BAB 3

KERANGKA KONSEPTUAL DAN HIPOTESIS PENELITIAN

BAB 3 KERANGKA KONSEPTUAL DAN HIPOTESIS PENELITIAN

3.1 Kerangka Konseptual



Penjelasan kerangka konseptual

Energi foton dari radiasi ionisasi menimbulkan kerusakan pada DNA sel asinar baik secara langsung maupun tidak langsung melalui radikal bebas hasil radiolisis air, terutama radikal OH* (Constantinides 1994 ; Fuks, 1998 ; Bushong, 1998 ; Wallace, 1998). Kerusakan DNA tersebut memicu fosforilasi beberapa protein kinase terutama ATM dan DNA-PK (Agarwal, 1998 ; Khosravi, 1998 ; Chebab 1999). ATM dan DNA-PK akan memfosforilasi *N terminal domain* p53 pada serine ke 15 (Yarnold, 1997 ; Canman, 1998 ; Rotman, 1998 ; Khosravi, 1999 ; Suzuki, 1999 ; Yan, 2000). Fosforilasi pada *N terminal domain* menyebabkan aktivitas p53 meningkat sekaligus menghambat fungsi MDM2. Demikian juga fosforilasi MDM oleh ATM mengakibatkan protein ini tidak dapat mengikat p53, jadi menghambat fungsinya. Hambatan fungsi MDM2 mengakibatkan degradasi p53 menurun (Khosravi, 1998).

Selain itu baik ATM maupun DNA-PK melalui mekanisme yang belum diketahui memicu fosforilasi p53 pada serine-20 yang menyebabkan stabilisasi p53 (Chebab, 1999). Stabilisasi ini menyebabkan degradasi p53 menjadi lebih sulit. Penurunan kecepatan degradasi menyebabkan waktu paruh p53 meningkat sehingga p53 yang aktif terakumulasi dalam sel (ekspresi p53 meningkat). Akumulasi p53 aktif ini menyebabkan aktivitas p53 meningkat berlebihan.

Aktivasi p53 menyebabkan transkripsi gen *Bax* meningkat dan transkripsi gen *Bcl2* menurun. *Bcl2* adalah inhibitor *Bax*, mencegah *Bax* membentuk homodimer dengan cara mengikat dan menjadikannya heterodimer (Burns, 1999). p53 yang terfosforilasi pada serine ke 15 akan langsung memicu transkripsi gen *Bax* (Jones, 1998 ; Choi,2000 ; Pearson,2000 ; Kagawa,2000). *Bax* akan memicu pelepasan *cytochrom-c* (Evan, 1998 ; Skulacev, 1998 ; Eskes,2000). *Cytochrom-c* akan berikatan dengan Apaf-1 menyebabkan aktivasi caspase (Green, 1998 ; Cotran 1999). Aktivitas caspase akan memotong DNA menjadi fragmen dengan ujung 3'OH dan berbagai perubahan morfologis apoptosis (Hetts,1998). Sedangkan fosforilasi pada sebagian yang lain akan menurunkan aktivitas cyclin-CDK kompleks yang mengakibatkan berhentinya siklus sel dan memicu terjadinya *repair* pada DNA (Cotran,1999).

Radiasi yang biasa digunakan untuk terapi adalah radiasi fraksinasi dengan dosis kecil dan diberikan berulang pada tiap 24 jam. Sumber kerusakan akibat radiasi adalah radikal bebas. Radikal bebas dapat menimbulkan kerusakan yang berkelanjutan meskipun sumber radiasi sudah dihilangkan, setiap reaksi radikal bebas dengan molekul sel akan menghasilkan radikal bebas baru yang lebih lemah, sampai radikal bebas tersebut dapat membentuk suatu ikatan yang stabil. Penelitian yang telah dilakukan membuktikan pada 24 jam setelah radiasi terjadi peningkatan ekspresi p53 yang bermakna pada beberapa organ tikus dan mencit.

Mengingat hubungan antara apoptosis, p53, kerusakan DNA dan radikal bebas maka dapat diperkirakan bahwa pada 48 jam setelah paparan dampak radiasi menjadi lebih lemah bila dibandingkan 24 jam setelah radiasi.

3.2 Hipotesis Penelitian

1. Terjadi peningkatan apoptosis dan ekspresi p53 pada 24 dan 48 jam setelah paparan radiasi ionisasi pada sel asinar kelenjar saliva.
2. Terdapat penurunan kualitas peningkatan apoptosis dan ekspresi p53 pada 48 jam setelah paparan radiasi dibandingkan dengan 24 jam setelah paparan radiasi.





BAB 4

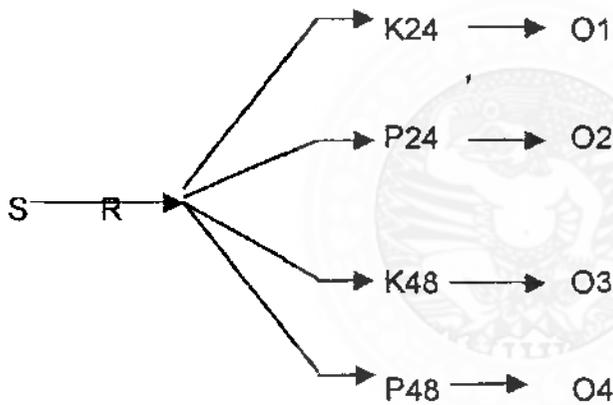
METODE PENELITIAN

BAB 4

METODE PENELITIAN

4.1 Rancangan Penelitian

Penelitian ini merupakan penelitian eksperimental dengan rancangan *post only control group design*. Rancangan tersebut dipilih dengan asumsi bahwa tiap unit populasi mempunyai karakteristik yang sama, maka pengukuran awal tidak perlu dilakukan. Selain itu secara teknik pada penelitian ini pengukuran awal tidak mungkin dilakukan (Zainuddin, 1999).



Keterangan

S : Sampel mencit sejumlah 6 ekor

R : Randomisasi

K24: Kelompok kontrol 24 dikorbankan bersamaan dengan kelompok P24

K48: Kelompok kontrol 48 dikorbankan bersamaan dengan kelompok P48

P24: Kelompok mencit yang diradiasi sinar γ dengan dosis 50 rad dan dikorbankan 24 jam setelah paparan

P48: Kelompok mencit yang diradiasi sinar γ dengan dosis 50 rad dan dikorbankan 48 jam setelah paparan

O1,O2,O3,O4 : Observasi dalam kelompok. Pengamatan ditujukan pada ekspresi p53 dan Apoptosis (fragmen DNA dengan ujung 3'OH).

4.2 Populasi, Sampel dan Besar Sampel

Populasi: Populasi penelitian adalah mencit strain BALB/c, berumur tiga bulan, sehat dengan berat badan berkisar 25 gram

Sampel: Sampel dibagi dalam empat kelompok secara acak

Besar sampel: Besar sampel ditentukan dengan rumus sebagai berikut

(Higgins, 1985):

$$n_i : \left(\frac{1}{1-f} \right) \left(\frac{2(Z_\alpha + Z_\beta)^2 (S)^2}{(\bar{X}_1 - \bar{X}_2)^2} \right)$$

n_i : jumlah sampel

Z_α 5% : 1,95

\bar{X}_1 : nilai rata-rata kelompok kontrol

Z_β 10% : 1,28

\bar{X}_2 : nilai rata-rata kelompok perlakuan

f : proporsi kegagalan 5%

S : simpangan baku kelompok kontrol

Penghitungan besar sampel terdapat dalam lampiran 1.

Berdasarkan penghitungan tersebut maka besar sampel = 6 yang diambil peneliti telah memenuhi ketentuan tersebut.

Kriteria Sampel:

1. Jenis kelamin : Jantan
2. Umur : 3 bulan
3. Berat badan : 25 gram

4.3 Variabel penelitian

Klasifikasi variabel

1. Variabel bebas : waktu pemeriksaan
2. Variabel kendali :
 1. Dosis radiasi
 2. metode penyinaran
 3. metode pewarnaan
 4. makanan mencit: Pur Q dan minuman mencit : Air PDAM
 5. kandang dan pemeliharaan mencit
3. Variabel tergantung:
 1. Ekspresi p53
 2. Jumlah sel apoptosis (sel yang mengandung fragmen DNA dengan ujung 3'OH)

Definisi Operasional Variabel:

1. Ekspresi p53 adalah jumlah sel asinar kelenjar parotis (SAKP) yang mengikat warna kit anti p53 sc-6243 dari Santa Cruz Biotech. per 100 sel SAKP.
2. Jumlah sel apoptosis adalah jumlah SAKP yang mengikat warna kit *Apoptag[®] plus peroxidase In Situ Apoptosis Detection Kit* dalam 100 SAKP.
3. Waktu pemeriksaan adalah selang waktu yang dihitung dari saat paparan radiasi selesai dilakukan sampai mencit dikorbankan.

Catatan : Istilah **ekspresi p53** dalam penulisan ini dimaksudkan untuk menggambarkan akumulasi p53 dalam sel akibat penurunan degradasi p53.

4.4 Unit Analisis :

Unit analisis adalah sel asinar kelenjar parotis (SAKP) mencit jantan strain BALB/c.

4.5 Instrumen Penelitian

Instrumen penelitian diuraikan pada lampiran 2

4.6 Lokasi dan Waktu Penelitian:

Persiapan, adaptasi, pemeliharaan dan pengorbanan mencit sebagai hewan coba dilakukan di UPT Hewan Coba Fakultas Farmasi Universitas Airlangga pada bulan Mei 2001. Pemberian paparan radiasi dilakukan di UPT Radiotherapi RS Adi Husada Surabaya pada bulan Juni 2001. Pemrosesan jaringan dan pewarnaan slide dilakukan di Laboratorium Patobiologi-GRAMIK Fakultas Kedokteran UNAIR pada bulan Juni sampai bulan Oktober 2001.

4.7 Prosedur Pelaksanaan Penelitian, Pengambilan dan Pengumpulan Data

Sebelum penelitian, dilakukan pemilihan mencit dari populasi yaitu strain BALB/c yang sesuai dengan kriteria sampel yaitu umur 3 bulan, jantan, sehat secara klinis dan berat badan sekitar 25 gram, dengan jumlah 10% lebih banyak dari yang diperlukan untuk cadangan. Mencit ditempatkan dalam kandang plastik yang tertutup jaring-jaring kawat dan dialasi sekam. Pakan dan minum yang diberikan sama dengan pakan dan minum sebelum dilakukan penelitian. Masa adaptasi dimaksudkan agar mencit terbiasa dengan alat fiksasi yang akan digunakan untuk radiasi dan melatih kemampuan peneliti untuk memfiksasi mencit tanpa menimbulkan stres yang berlebihan pada mencit. Sejumlah mencit tersebut dibagi

menjadi 4 kelompok secara random dan diberi label K24, K48, P24 dan P48.

Alat fiksasi yang digunakan dibuat dari tabung bekas tempat film yang terbuat dari plastik. Dasar tabung dibuat lubang sebesar kepala mencit dan tepi yang lain dibuat enam lubang sebesar lidi. Mencit dimasukkan dengan kepala masuk ke lubang dasar tabung dan bagian belakang di fiksasi dengan menyilangkan tiga lidi antara dua lubang yang telah dibuat. Mencit yang telah terfiksasi tersebut ditempatkan dalam alat radiasi. Untuk memfiksasi tabung digunakan selotip.

Dosis radiasi diatur dengan dosimeter yang menjadi satu kesatuan dengan alat radioterapi. Untuk mencari waktu penyinaran yang sesuai dengan dosis yang dikehendaki digunakan tabel yang telah ditera sesuai dengan umur sumber radiasi. Dengan melihat luas permukaan penyinaran, kedalaman penyinaran serta dosis yang dikehendaki dalam tabel didapatkan waktu yang diperlukan untuk penyinaran. Kelompok P24 dan kelompok P48 diradiasi dengan dosis 50 rad, sedangkan kelompok K24 dan K48 diradiasi 0 rad.

Kelompok P24 dan K24 dikorbankan 24 jam setelah radiasi dan kelompok K48 dan P48 dikorbankan 48 jam setelah radiasi. Mencit dikorbankan dengan teknik *single fixatif*, kemudian kedua kelenjar parotis diambil dan dimasukkan dalam larutan buffer formalin 10%. Selanjutnya jaringan tersebut diproses menjadi sediaan yang berbentuk blok parafin (teknik pemrosesan dapat dilihat pada lampiran

3). Kemudian dibuat banyak potongan dengan mikrotom setebal 4 - 6 mikron. Hasil potongan ditempatkan dalam beberapa *object glass* yang telah diberi *polylysine* untuk selanjutnya dilakukan pemrosesan untuk pemeriksaan apoptosis dan ekspresi p53.

Pemeriksaan sel apoptosis dilakukan dengan metode TUNEL assay. Prinsip kerja metode ini adalah memberi label pada ujung 3'OH fragmen DNA yang sangat banyak ditemukan pada sel yang mengalami apoptosis maupun pada *apoptotic bodies*. Dasar teknologi, prinsip dan prosedur pemrosesan sediaan dengan TUNEL assay lebih lanjut diuraikan dalam lampiran 4. Kit yang digunakan adalah Kit dari Intergen yaitu : *S7101 Apoptag[®] Plus Peroxidase In Situ Apoptosis Detection Kit*.

Slide yang digunakan untuk pemeriksaan ekspresi p53 diproses dengan teknik imunohistokimia. Proses tersebut dilakukan dengan *kit Immunocruz Staining System anti p53* dari *Santa Cruz Biotechnology* dengan nomor katalog sc-6243. Prosedur pemrosesan sediaan diuraikan dalam lampiran 5.

Slide yang telah diwarnai diamati dengan mikroskop cahaya dengan pembesaran 400 kali. Penghitungan sel yang positif terwarnai dilakukan dengan bantuan *grateculae*. Tiap slide dihitung lima area hitung yang berbeda. Hasil penghitungan sel apoptosis dan sel yang mengandung p53 disajikan diambil rata-rata dan dianalisis.

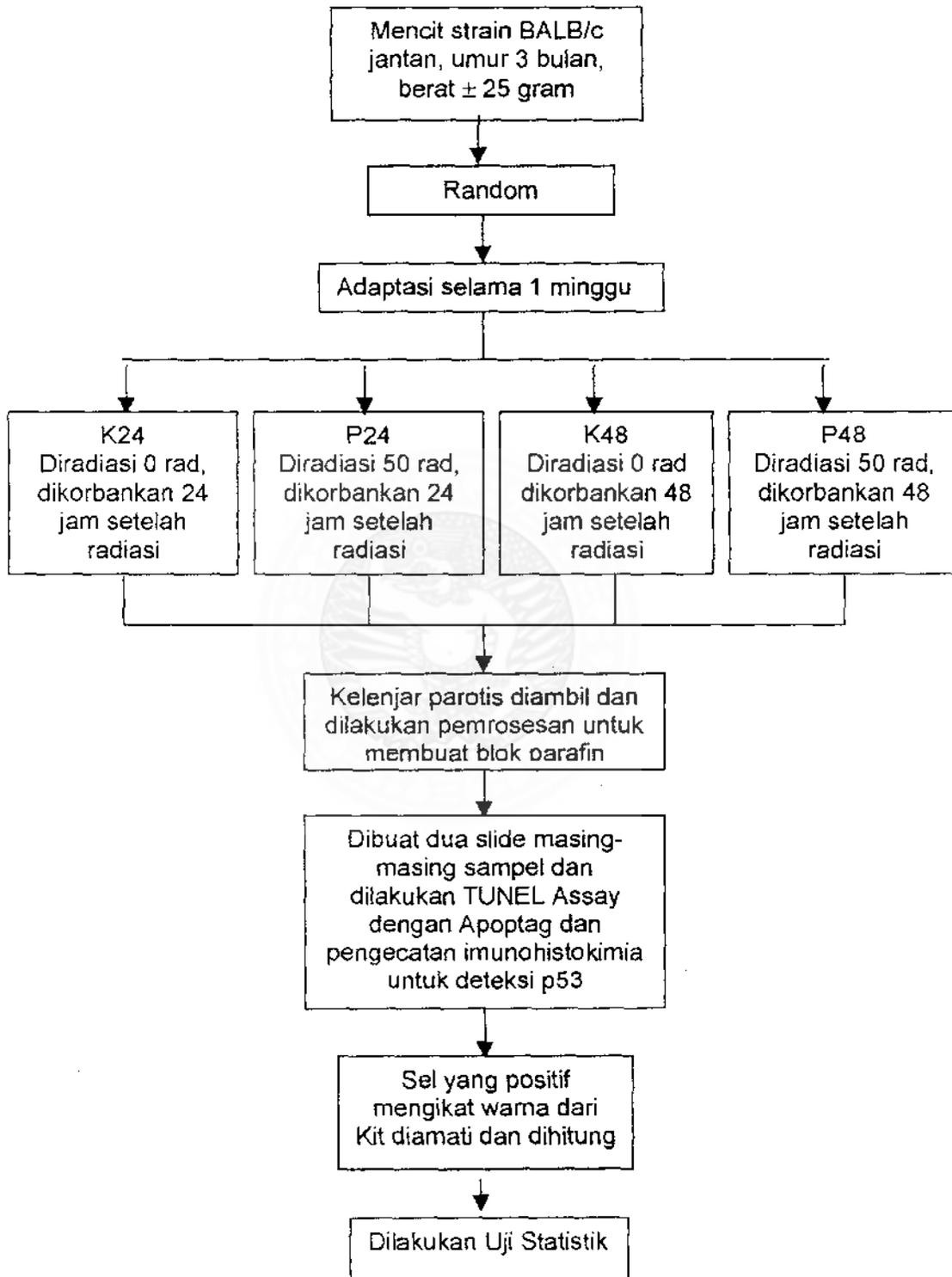
4.8 Cara Analisis Data

Data dianalisis untuk membuktikan hipotesis yang telah disusun.

1. Hipotesis 1: digunakan *Multivariate Analysis of Variance* (Manova), bila ada perbedaan dilanjutkan dengan Anova dan *Least Significant Difference* (LSD) dengan $\alpha = 0.05$ dan hasil uji bermakna bila diperoleh harga $p < 0.05$ (Stell & Torrie, 1995).
2. Hipotesis 2: digunakan Manova dan Anova pada selisih antara kelompok kontrol dan kelompok perlakuan.



4.9 Kerangka Operasional Penelitian





BAB 5

ANALISIS HASIL PENELITIAN

BAB 5

ANALISIS HASIL PENELITIAN

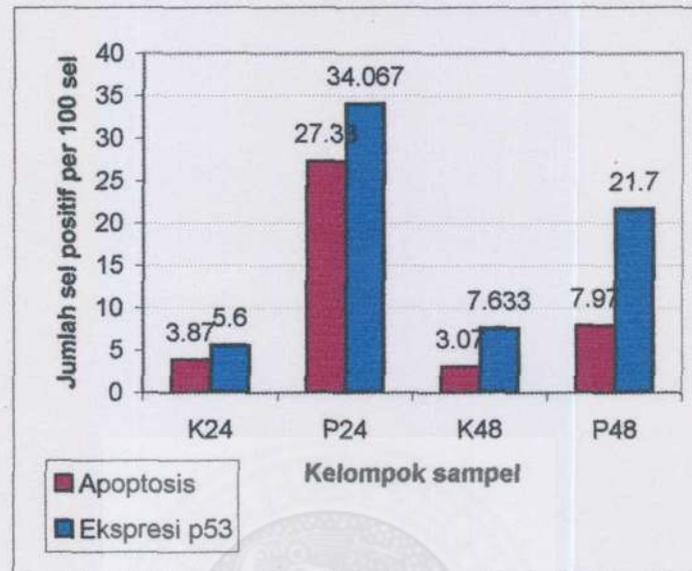
5.1 Data Hasil Penelitian

Pengamatan dan penghitungan sel apoptosis dan ekspresi p53 dilakukan dibawah mikroskop cahaya dengan pembesaran 400 kali. Sel yang mengalami apoptosis dan ekspresi p53 akan berwarna coklat sedangkan sel normal lainnya hanya akan menyerap warna dari *counterstain* yang diberikan. Sebagai *counterstain* untuk pemeriksaan apoptosis digunakan *methyl green* sedangkan *counterstain* untuk ekspresi p53 digunakan *Gill's formulation's of Hematoxilin*. Untuk menjaga agar sel yang telah dihitung tidak dihitung kembali dan adanya sel yang tidak terhitung digunakan *grateculae*, yang dipasang pada lensa okuler. Sel yang positif menyerap warna dari reagen (coklat) dihitung pada tiap 100 sel asinar.

Tabel 5.1 Rerata jumlah sel asinar kelenjar parotis yang mengalami apoptosis dan ekspresi p53 pada tiap 100 sel asinar

Variabel	Kelompok	Rerata	Stand. Dev
Ekspresi p53	K24	5.6000	0.3795
	P24	34.0667	5.1562
	K48	7.6333	0.4633
	P48	21.7000	1.4953
Apoptosis	K24	3.8667	0.4502
	P24	27.3333	3.2439
	K48	3.0667	1.0482
	P48	7.9667	0.3445

Hasil penghitungan sel yang mengalami apoptosis dan ekspresi p53 dapat dilihat pada lampiran 6 dan 7. Rerata hasil penghitungan perkelompok perlakuan disajikan pada tabel 5.1 dan gambar 5.1

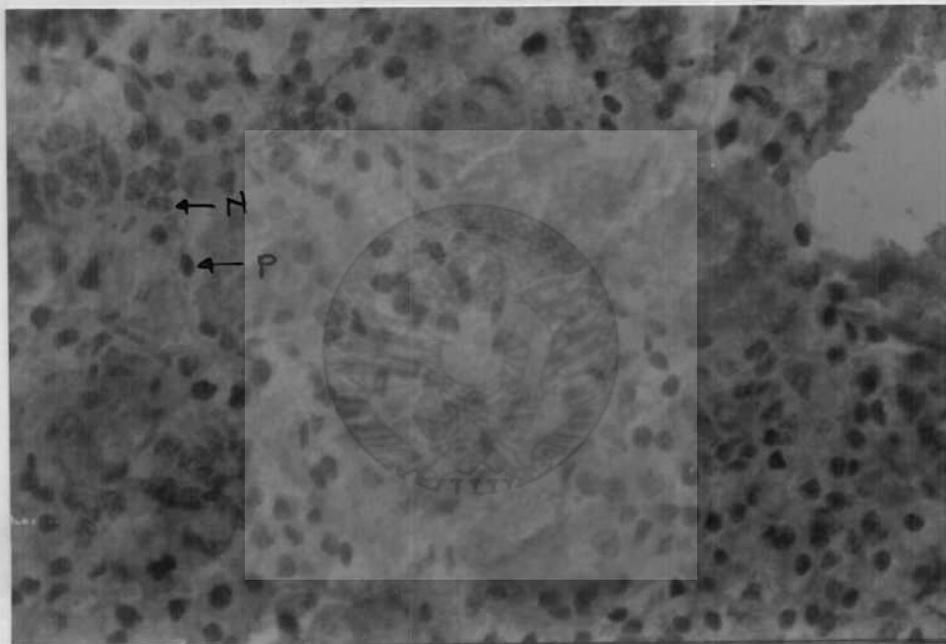


Gambar 5.1. Diagram batang rerata jumlah sel asinar kelenjar parotis mencit strain BALB/c jantan yang mengalami apoptosis dan ekspresi p53 per 100 sel.

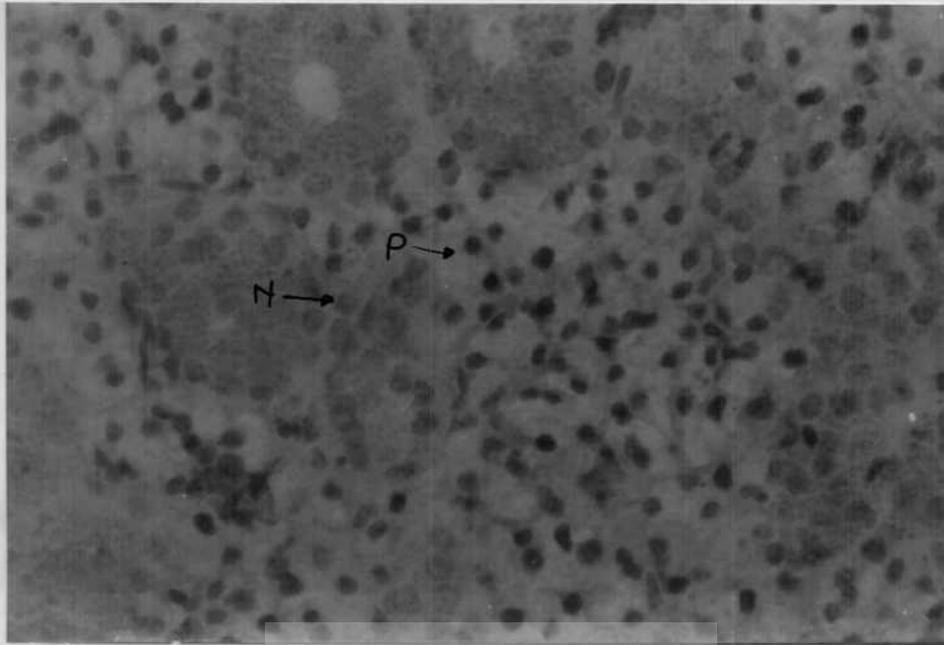
Hasil pewarnaan ekspresi p53 pada sel asinar kelenjar parotis mencit disajikan pada gambar 5.2, 5.3 dan 5.4. Gambar 5.2 diambil dari mencit yang terpapar radiasi ionisasi 50 rad dan dikorbankankan 24 jam setelah radiasi. Gambar 5.3 diambil dari mencit yang terpapar radiasi ionisasi 50 rad dan dikorbankankan 48 jam setelah paparan. Sedangkan gambar 5.4 diambil dari kelompok kontrol. Teknik imunohistokimia yang dipakai adalah imunohistokimia *indirect* dengan peroksidase sebagai label. Ekspresi p53 terlihat coklat dalam inti sel karena p53 diikat dengan antibodi yang digunakan dalam pewarnaan. Selanjutnya antibodi tersebut diikat dengan antibodi sekunder yang kemudian dapat mengikat peroksidase sehingga sel berwarna kecoklatan.

Hasil pengamatan apoptosis dengan TUNEL assay disajikan dalam gambar 5.5, 5.6, dan 5.7. Gambar 5.5 dan 5.6 diambil dari kelompok yang

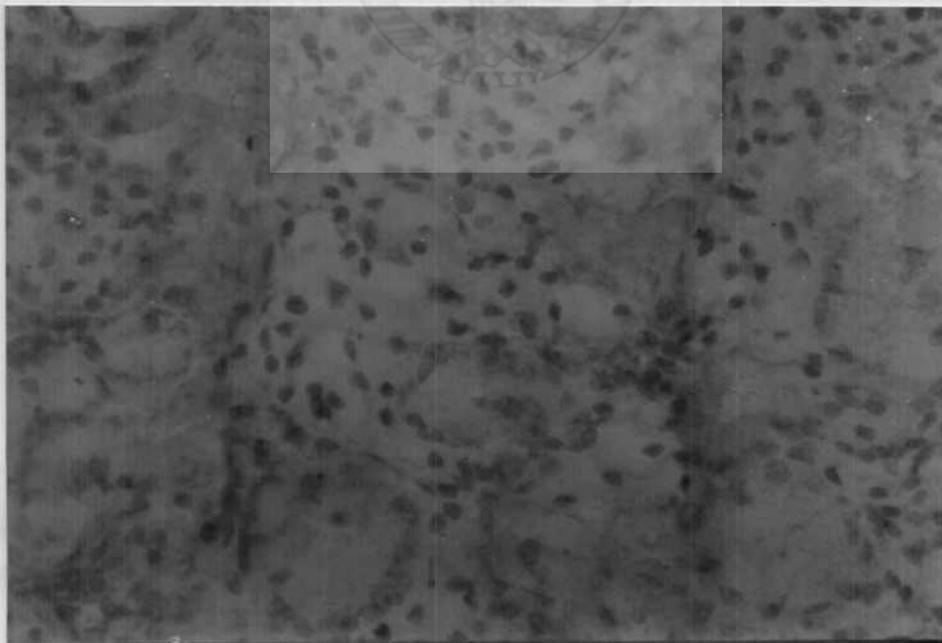
dipapar radiasi 50 rad. Gambar 5.5 diambil dari kelompok yang dikorbankan 24 jam setelah radiasi dan gambar 5.6 diambil dari mencit yang dikorbankan 48 jam setelah radiasi. Gambar 5.7 diambil dari kelompok yang tidak terpapar radiasi (kelompok kontrol). Sel yang positif adalah sel yang berwarna kecoklatan. Sel yang dihitung adalah sel asini, sel epitel ductus, leukosit dan sel yang lain baik negatif maupun positif tidak diikuti sertakan dalam penghitungan.



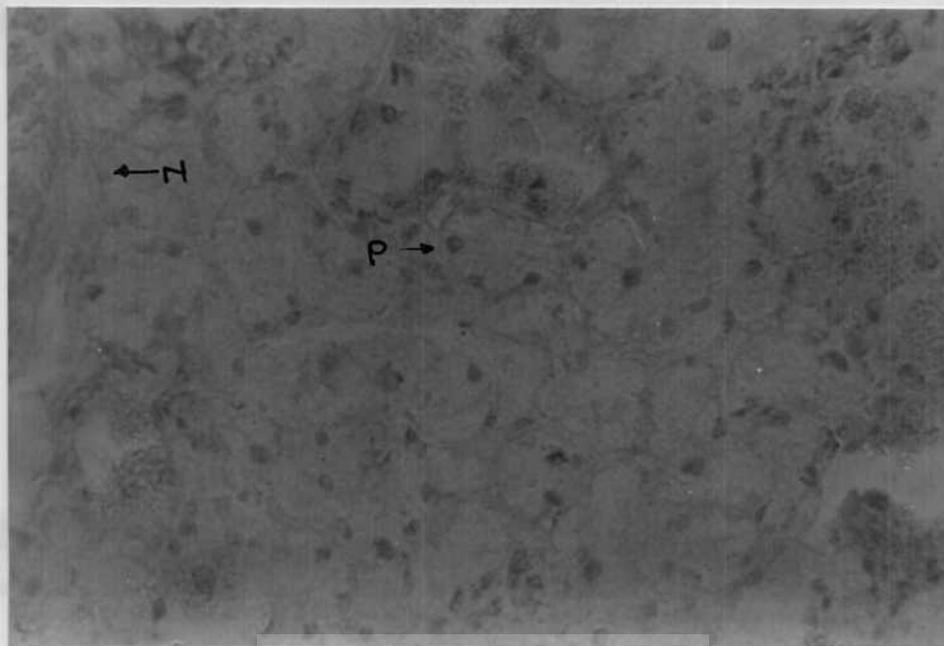
Gambar 5.2. Hasil pewarnaan ekspresi p53 dengan teknik imunohistokimia pada jaringan kelenjar parotis mencit jantan strain BALB/c yang terpapar radiasi 50 rad yang dikorbankan 24 jam setelah paparan radiasi. Ekspresi positif (P) berwarna coklat keunguan sedangkan ekspresi negatif (N) berwarna ungu muda. (Pembesaran 400 X)



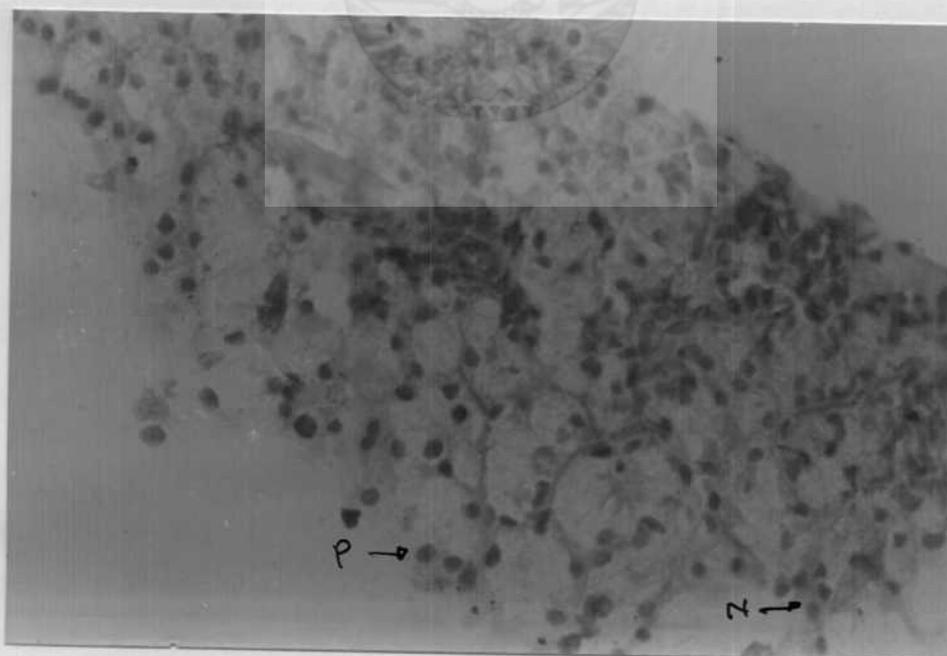
Gambar 5.3. Hasil perwarnaan ekspresi p53 dengan teknik imunohistokimia pada jaringan kelenjar parotis mencit strain BALB/c jantan yang terpapar radiasi 50 rad dan dikorbkan 48 jam setelah paparan radiasi. Inti sel asini positif, berwarna coklat keunguan (P) relatif lebih sedikit daripada gbr 5.2. Inti sel negatif (N) berwarna ungu. (Pembesaran 400 X)



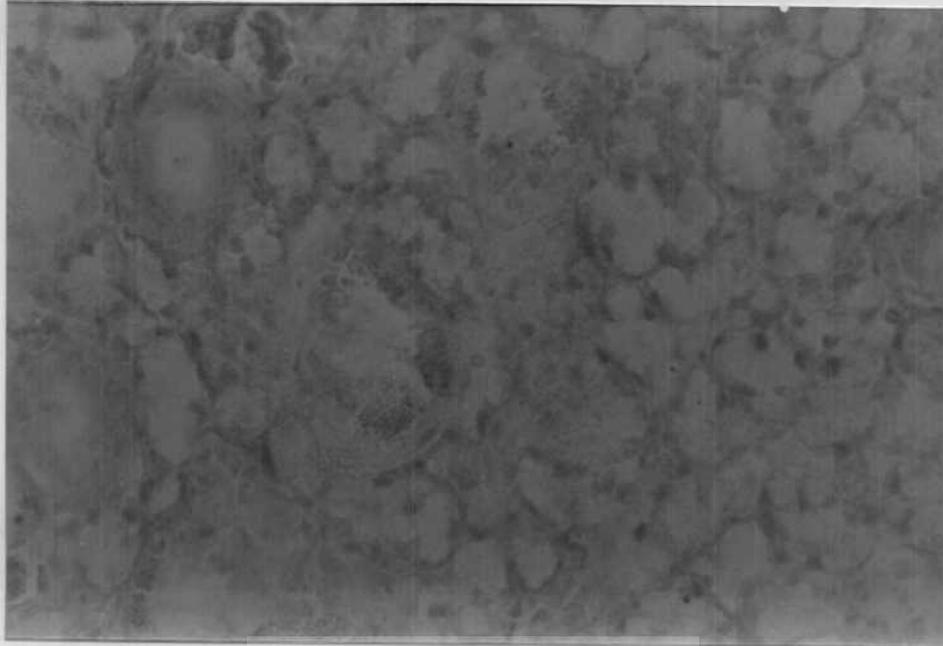
Gambar 5.4 Hasil perwarnaan p53 dengan teknik imunohistokimia pada jaringan kelenjar parotis mencit strain BALB/c jantan yang tidak terpapar radiasi. Hampir seluruh inti sel berwarna ungu muda (negatif) (Pembesaran 400 X).



Gambar 5.5 Hasil perwarnaan apoptosis dengan *TUNEL* assay pada kelenjar parotis mencit strain BALB/c jantan yang terpapar radiasi ionisasi 50 rad dan dikorbkan 24 jam setelah radiasi. Apoptosis positif (P) berwarna coklat kehijauan sedangkan negatif (N) terlihat hijau. (Pembesaran 400 X)



Gambar 5.6 Hasil perwarnaan apoptosis dengan *TUNEL* assay pada kelenjar parotis mencit strain BALB/c jantan yang terpapar radiasi ionisasi 50 rad dan dikorbkan 48 jam setelah radiasi. Apoptosis positif (P) yang berwarna coklat kehijauan relatif lebih sedikit daripada gambar 10. Apoptosis negatif (N) berwarna hijau. (Pembesaran 400 X)



Gambar 5.7 Hasil perwarnaan apoptosis dengan *TUNEL* assay pada kelenjar parotis mencit strain BALB/c jantan yang tidak terpapar radiasi. Tidak terlihat sel yang positif tercat. (Pembesaran 400 X)

5.2 Analisis Data Hasil Penelitian

Sebelum dianalisis data perlu diuji normalitas dan homogenitas agar hasil analisis dapat diyakini kebenarannya sehingga kesimpulan yang diambil tidak keliru. Untuk menguji normalitas data digunakan uji Normal P-P Plot. Dari kurva yang tergambar dapat dilihat bahwa data: p53 pada kelompok kontrol (K24-K48), apoptosis pada kelompok kontrol (K24-K48), p53 pada kelompok perlakuan (P24-P48) maupun apoptosis pada kelompok perlakuan (P24-P48) berdistribusi normal. Hasil uji homogenitas menunjukkan data sel apoptosis maupun ekspresi p53 dari hasil pengamatan homogen dalam taraf nyata $< 0,05$, sehingga data layak untuk dianalisis. Hasil uji normalitas dan homogenitas dapat dilihat dalam lampiran 8.

Analisis awal dilakukan untuk mengetahui adanya perbedaan jumlah sel apoptosis dan ekspresi p53 diantara kelompok sampel. Analisis dilakukan dengan MANOVA. Hasil uji multivariat Wilks' Lambda menunjukkan terdapat perbedaan ($p < 0,05$) diantara kelompok sampel, sehingga dapat disimpulkan bahwa pemaparan radiasi mempunyai efek pada variabel yang diamati (jumlah sel apoptosis dan ekspresi p53).

Uji ini dilanjutkan dengan uji ANOVA untuk melihat variabel mana yang berperan dalam menimbulkan terjadinya perbedaan tersebut. Hasil uji menunjukkan bahwa kedua variabel berperan dalam memunculkan perbedaan dengan tingkat signifikan yang sama yaitu 0,000. Hasil uji tersebut secara lengkap dapat dilihat pada lampiran 9.

Selanjutnya dilakukan uji LSD dengan taraf signifikan : 0.05 untuk melihat perbedaan antar kelompok sampel. Kelompok sampel yang berbeda sama pada kedua variabel (Apoptosis dan ekspresi p53) dan hasil tersebut dapat dilihat pada tabel dibawah ini:

Tabel 5.2. Hasil uji LSD jumlah sel apoptosis dan ekspresi p53 antar kelompok sampel.

	K24	P24	K48	P48
K24	-	*	-	*
P24	*	-	*	*
K48	-	*	-	*
P48	*	*	*	-

* hasil analisis bermakna pada taraf nyata $P < 0,05$

Hasil uji selengkapnya dapat dilihat pada lampiran 10.

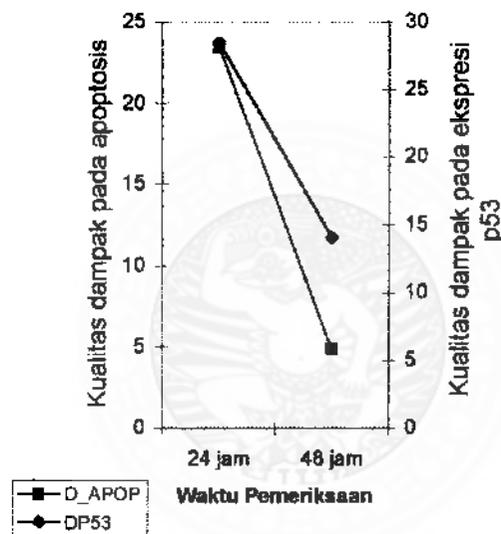
Dari tabel diatas dapat dilihat bahwa jumlah sel apoptosis dan ekspresi p53 pada kedua kelompok kontrol (K24 dan K48) tidak berbeda nyata. Sedangkan antara kelompok kontrol dengan kelompok yang dikorbankan 24 jam setelah paparan radiasi (P24) dan kelompok yang dikorbankan 48 jam setelah paparan radiasi (P48) berbeda nyata. Antara kelompok yang dikorbankan 24 jam setelah paparan radiasi (P24) dengan kelompok yang dikorbankan 48 jam setelah paparan radiasi (P48) berbeda nyata. Apabila melihat grafik rata-rata maka dari hasil tersebut maka dapat disimpulkan bahwa jumlah sel apoptosis dan ekspresi p53 pada kelompok yang dikorbankan 24 jam dan 48 jam setelah paparan radiasi lebih tinggi daripada kelompok tidak diberi paparan radiasi. Jumlah sel apoptosis dan ekspresi p53 pada kelompok yang dikorbankan 48 jam setelah paparan radiasi lebih rendah daripada kelompok yang dikorbankan pada 24 jam setelah paparan radiasi.

Untuk dapat melihat perbandingan kualitas dampak radiasi terhadap jumlah sel apoptosis dan ekspresi p53 pada 24 jam dan 48 jam setelah paparan maka efek dari maturasi harus dihilangkan terlebih dahulu. Data dirubah menjadi data Δ (D), jumlah sel yang mengalami apoptosis dan ekspresi p53 pada kelompok yang dipapar radiasi dikurangi jumlah sel yang mengalami apoptosis dan ekspresi p53 pada kelompok kontrol dan dikorbankan pada saat yang sama. Dari pengurangan tersebut diperoleh data baru yaitu data Δ apoptosis (D_APOP) dan data Δ p53 (DP53) yang terdiri dari kelompok 24 jam

(P24-K24) dan kelompok 48 jam (P48-K48). Untuk melihat perbedaan diantara kelompok data, digunakan MANOVA. Uji Multivariat dari Wilks' Lambda menunjukkan ada perbedaan diantara kelompok data ($p < 0.05$). Hal tersebut diartikan bahwa ada perbedaan pada kualitas dampak radiasi pada jumlah sel apoptosis dan ekspresi p53 pada 24 jam dan 48 jam setelah paparan. Apabila melihat rata-rata kelompok data D_APOP (\bar{x} , 24 jam = 23.4667 ; 48 jam = 4.9000) dan DP53 (\bar{x} , 24 jam = 28,4667 ; 48 jam = 14.0667) maka dapat disimpulkan bahwa terjadi penurunan kualitas dampak radiasi pada jumlah sel apoptosis dan ekspresi p53 pada 48 jam setelah paparan dibandingkan pada 24 jam setelah paparan.

Dari hasil ANOVA didapatkan perbedaan pada masing-masing kelompok data, baik pada D_APOP maupun DP53 ($p < 0,05$), maka dapat diartikan bahwa kedua variabel yang diamati berperan dalam menimbulkan perbedaan tersebut. Dari hal tersebut dapat disimpulkan terjadi penurunan kualitas dampak radiasi baik terhadap apoptosis maupun terhadap ekspresi p53 pada 48 jam setelah paparan bila dibandingkan dengan 24 jam setelah paparan.

Dari tabel dapat dilihat hasil F hitung pada kelompok data apoptosis (174.356) lebih tinggi dibandingkan dengan F hitung kelompok data p53 (41.005), hal tersebut dapat diartikan bahwa penurunan kualitas dampak radiasi terhadap jumlah sel yang mengalami apoptosis lebih hebat dari pada dampak terhadap jumlah ekspresi p53 (gambar 5.8). Hasil analisis Manova dan Anova pada data Δ selengkapnya dapat dilihat pada lampiran 11.



Gambar 5.8. Grafik penurunan kualitas dampak radiasi pada 48 jam setelah paparan dibandingkan dengan 24 jam setelah paparan.



BAB 6

PEMBAHASAN

BAB 6**PEMBAHASAN**

Fakta yang melatarbelakangi penelitian ini adalah efek samping dari terapi radiasi yang belum dapat ditangani dengan baik, maka radiasi ionisasi yang dipakai dalam penelitian adalah radiasi sinar γ yang biasa digunakan untuk terapi suatu keganasan. Dosis 50 rad dan waktu pemeriksaan pada 24 jam dan 48 jam setelah paparan, diambil dengan pertimbangan bahwa dosis yang dipakai untuk terapi adalah dosis terbagi atau disebut radiasi fraksinasi yang besarnya 200 rad dan pemberian diulang tiap 24 jam. Mengingat binatang coba yang digunakan adalah mencit yang relatif lebih peka terhadap radiasi daripada manusia maka dosis diperkecil sampai seperempatnya yakni 50 rad.

Dari hasil penelitian ini tampak nyata ada peningkatan ekspresi p53 dan jumlah sel apoptosis pada 24 dan 48 jam setelah paparan radiasi ionisasi. Peningkatan ekspresi p53 disebabkan karena akumulasi p53 dalam sel yang timbul akibat penurunan kecepatan degradasi p53, sehingga waktu paruh p53 menjadi lebih panjang (Burns, 1999).

Degradasi p53 dilakukan oleh ubiquitin. Proses degradasi ini dibantu oleh MDM2 yang berfungsi sebagai *E3 ubiquitin protein ligase*. MDM2 berikatan dengan p53 pada *N-terminal domain*. MDM2 tidak bisa mengikat p53 jika MDM2 terfosforilasi atau p53 telah terfosforilasi pada *N-terminal domainnya*. Penurunan fungsi MDM2 ini telah dinyatakan sebagai

penyebab utama dari peningkatan waktu paruh p53 (Khosravi 1999 ; Chebab,1999).

Mekanisme peningkatan fosforilasi MDM2 dan fosforilasi p53 pada 24 dan 48 jam setelah paparan radiasi ionisasi, yang tampak sebagai peningkatan ekspresi p53, diuraikan dibawah ini. Fosforilasi MDM2 dan p53 pada paparan radiasi ionisasi timbul sebagai respons terhadap adanya kerusakan DNA (Di Leonardo,1994 ; Wang,1996 ; Canman,1997 ; Kapoor,1998 ; Khosravi,1999 ; Burns,1999 ; Cotran,1999). Kerusakan DNA yang terjadi setelah paparan radiasi ionisasi diakibatkan oleh sifat DNA sebagai molekul yang paling peka terhadap radiasi ionisasi dibanding dengan struktur sub sel yang lain (Bushong, 1998 ; Wani, 1999; Ross, 1999; Aranda-Anzaldo, 1999; Kondo, 1998; Teyssier,1999). Energi foton yang ada dalam radiasi ionisasi menyebabkan elektron pada orbit terluar atom dapat terlepas sehingga membentuk radikal bebas dan menghasilkan energi foton sekunder. Radikal bebas maupun energi foton ini dapat dengan sangat mudah berikatan dengan molekul didekatnya, sehingga dapat menimbulkan kerusakan pada molekul (Fuks,1995).

Unit analisis penelitian ini adalah sel asinar kelenjar saliva yang relatif sangat banyak mengandung air dibandingkan dengan sel yang lain. Air adalah senyawa yang sangat mudah terurai menjadi radikal bebas H^* , OH^* dan H_2O_2 bila terpapar radiasi ionisasi, maka apabila sel asinar terpapar radiasi, radikal bebas yang terbentuk akan relatif lebih banyak. Radikal bebas tersebut terutama OH^* (hidroksil radikal) dapat menyebabkan kerusakan DNA. Kerusakan DNA melalui radikal bebas

hasil radiolisis air ini yang terutama menyebabkan kerusakan DNA pada sel yang terpapar radiasi ionisasi (Bushong 1998).

Kerusakan DNA akibat radiasi ionisasi dapat menyebabkan akumulasi p53 dengan perantaraan beberapa protein kinase yang tergolong *phosphotidil inositol 3 kinase* yaitu ATM, ATR dan DNA-PK. Kerusakan DNA memicu fosforilasi protein kinase tersebut. Diantara beberapa protein kinase tersebut, protein ATM tampaknya hanya diaktivasi oleh kerusakan DNA akibat radiasi ionisasi, bukan oleh sebab lain (Yarnold,1997 ; Canman,1998 ; Rotman,1998 ; Khosravi,1999 ; Suzuki,1999 ; Yan, 2000). ATM akan memfosforilasi p53 pada serine ke 15, beberapa literatur lain menyebutkan serine ke 37 juga terfosforilasi, pada *N-terminal domain* p53. Fosforilasi ini menyebabkan aktivasi p53 dan menghambat aktivitas MDM2 (Khosravi,1999 ; Burns 1999).

Dari penelitian ini diketahui bahwa pada 24 jam setelah paparan radiasi 50 rad terjadi peningkatan 7 kali lipat dan menurun menjadi 3 kali lipat pada 48 jam setelah radiasi. Seperti telah dijelaskan terdahulu, peningkatan ekspresi p53 menandakan kerusakan DNA maka dapat dikatakan pada dosis 50 rad dapat terjadi kerusakan DNA yang sangat parah.

Ekspresi p53 pada kelompok kontrol yang tidak diberi paparan radiasi sangat sedikit bila dibandingkan dengan ekspresi pada kelompok paparan. Pada sel normal p53 ini dijaga agar kadarnya tetap rendah dan tidak aktif. Protein 53 (p53) yang aktif/bebas pada sel normal mempunyai waktu paruh yang sangat pendek yaitu 20 – 30 menit. Hal tersebut

mengakibatkan p53 pada sel normal sangat sulit untuk dideteksi pada sel yang tidak mengalami stres (Burns,1999 ; Cotran,1999). Ekspresi p53 pada kelompok kontrol kemungkinan disebabkan oleh *false* positif pada pengecatan dan kesalahan pada pemrosesan jaringan.

Dosis yang dipakai dalam penelitian ini relatif sangat kecil bila dibandingkan dengan dosis total yang diberikan pada terapi. Hal ini dapat menimbulkan pertanyaan tentang kebenaran tentang kerusakan DNA yang terjadi. Namun demikian, selain faktor jenis spesies yang digunakan sebagai binatang coba (mencit adalah spesies yang relatif peka terhadap radiasi ionisasi), faktor jenis sel kemungkinan sangat berperan dalam hal ini. Beberapa literatur menyebutkan bahwa pada dosis sekitar 50 rad dapat menyebabkan berbagai perubahan ekspresi protein pada beberapa jenis sel (Wang,1996^a ;Wang, 1996^b ; Bushong,1998 ; Cotran,1999). Sel asinar adalah sel yang banyak mengandung air. Seperti telah disebutkan diatas, air adalah senyawa yang sangat mudah menjadi radikal bebas apabila terkena radiasi ionisasi. Hal ini yang menyebabkan kemungkinan sel asinar lebih peka terhadap radiasi daripada sel lain, meskipun diperlukan penelitian yang membuktikan hal tersebut.

Apoptosis ditemukan meningkat sangat bermakna. Peningkatan apoptosis hampir 9 kali lipat terjadi pada 24 jam setelah paparan radiasi bila dibandingkan dengan kontrol. Pada saat itu terjadi pengulangan paparan radiasi (paparan radiasi kedua), ada jejas baru, sehingga kerusakan menjadi lebih parah. Demikian juga 48 jam setelah paparan pertama masih terjadi dampak dari radiasi pertama berupa peningkatan 3

kali lipat ditambah dampak radiasi kedua berupa peningkatan apoptosis 7 kali lipat dan pada saat itu diberi paparan radiasi yang ketiga. Hal ini akan terus berlanjut sampai akhir terapi dan dapat diperkirakan akumulasi jumlah sel yang mengalami apoptosis yang terjadi. Bisa disimpulkan bahwa sel asini dapat mati tanpa menimbulkan inflamasi sehingga tidak didapatkan fibrosis. Ruang yang ditinggalkan sel asini dapat ditempati oleh struktur lain sehingga atropi bisa tidak dapat diamati dengan segera. Pada 48 jam setelah paparan radiasi masih didapatkan dampak terhadap apoptosis dan ekspresi p53 karena reaksi radikal bebas berkelanjutan selain proses membutuhkan waktu. Proses apoptosis hanya membutuhkan waktu beberapa jam sehingga dalam waktu 48 jam proses bisa terjadi berulang-ulang. Dari hal tersebut dapat disimpulkan bahwa setelah paparan radiasi terjadi pengurangan jumlah sel asinar yang hebat setelah paparan radiasi yang berakibat penurunan sekresi saliva secara drastis.

Tampak nyata antara peningkatan ekspresi p53 dan apoptosis berjalan seiring. Hal ini menunjukkan bahwa kerusakan DNA akibat radiasi ionisasi memicu apoptosis yang diperantarai oleh p53. Hasil analisis data menunjukkan terdapat perbedaan antara perubahan kualitas peningkatan apoptosis dan peningkatan ekspresi p53 pada 24 jam dan 48 jam setelah paparan. Hal ini menunjukkan bahwa peningkatan apoptosis dan ekspresi p53 adalah proses yang berbeda. Hal tersebut dapat dimengerti karena p53 membutuhkan banyak sekali produk gen lainnya dalam memicu apoptosis. Selain itu terdapat peran ganda dari p53 yaitu *cell cycle arrest*

selain apoptosis. Selain kualitas dan jenis jejas, faktor lain yang mempengaruhi hasil aktivitas p53, apoptosis atau *cell cycle arrest* adalah perbedaan tipe sel, keberadaan *survival factor* dan jumlah ekspresi oncogen. Jenis sel berpengaruh pada efek p53 seperti hasil penelitian yang menunjukkan bahwa p53 menyebabkan *cell cycle arrest* pada *fibroblast diploid* manusia yang mengalami kerusakan DNA, sedangkan sel mieloid dan limfoid mengalami apoptosis setelah paparan radiasi (Burns, 1999).

Sel yang mengalami apoptosis sangat sulit dideteksi dengan pengecatan rutin. Proses apoptosis berjalan cepat dan tidak disertai dengan peradangan. Kerusakan sel yang terjadi biasanya tunggal atau beberapa sel tanpa peradangan pada jaringan sekitarnya. Beberapa hal diatas menyebabkan sel atau jaringan yang mengalami apoptosis sangat sulit ditemukan meskipun proses apoptoisis terjadi sangat hebat. Berbagai penelitian yang dilakukan terdahulu belum dapat secara pasti membuktikan nekrosis, gangguan fungsi sekresi, fibrosis inflamasi. Hasil penelitian yang dilakukan oleh O. Connel, 1999, menunjukkan penurunan pada berat basah kelenjar, sel asinar menempati ruang yang lebih sedikit dan *intercalated duct* serta *striated duct* menempati ruang yang relatif lebih besar. Beberapa fakta tersebut mendukung dugaan apoptosis pada sel asinar kelenjar saliva yang menyebabkan xerostomia pada terapi radiasi, meskipun masih diperlukan penelitian yang dapat membuktikan hal tersebut secara klinis.

Untuk dapat mengamati ekspresi p53 digunakan pemeriksaan imunohistokimia cara tidak langsung (*indirect*) yang menggunakan antibodi yang spesifik yang dapat mengikat antigen p53. Semakin banyak p53 yang berada dalam sel semakin banyak ikatan yang terjadi. Imunohistokimia cara tak langsung memakai antibodi sekunder yang akan mengikat antibodi primer. Antibodi sekunder kemudian diberi label. Penggunaan antibodi sekunder yang dapat mengikat antibodi primer yang telah terikat dengan p53 ini mempermudah pengamatan dibawah mikroskop. Sel yang banyak mengandung p53 akan jelas terwarnai dengan label peroksidase yang ada pada antibodi sekunder dan sel normal tidak terwarnai. *Gill's formulation of Hematoxilin* digunakan sebagai counterstain bagi inti sel yang normal sehingga ekspresi p53 pada kelompok sampel dapat dihitung dalam persentase dan dibandingkan.

Metode yang dipakai untuk mendeteksi apoptosis pada penelitian ini adalah *TUNEL assay* karena dengan metode ini sel yang mengalami apoptosis dapat dengan mudah diamati dan dibedakan dengan sel yang lain. Seperti telah dijelaskan dimuka bahwa sel yang mengalami apoptosis akan mengalami fragmentasi DNA yang khas. Salah satu karakteristik fragmen DNA yang dihasilkan pada apoptosis adalah fragmen tersebut mempunyai ujung 3'OH. Fragmen DNA dengan ujung 3'OH ini sangat banyak ditemukan pada sel yang mengalami apoptosis maupun pada *apoptotic bodies* dan sangat sedikit ditemukan pada sel normal maupun sel yang mengalami nekrosis. Prinsip kerja metode *Tunnel assay* adalah menyambung ujung 3'OH fragmen tersebut dengan oligomer yang

merupakan rangkaian nukleotida triphosphat. Reaksi ini dikatalisis oleh enzim tdt (*terminal deoxynucleotidyl transferase*). Rangkaian nukleotida tersebut diberi label secara acak. Jenis label disesuaikan dengan keperluan. Pada *TUNEL assay indirect* label yang digunakan adalah *digoxigenin*. Pemberian label secara acak pada rangkaian nukleotida tersebut bertujuan untuk memicu ikatan antara *digoxigenin* dan *anti digoxigenin*. Selanjutnya *digoxigenin* mengikat *antidigoxigenin peroxidase conjugate* yang kemudian mengikat DAB (*diamino benzidine*) substrat sehingga berwarna coklat. Pelabelan dengan *digoxigenin* mempunyai kelebihan karena molekul ini berasal dari tanaman, sehingga tidak ada pada hewan dan manusia akhirnya hasil positif palsu dapat dihindari. Dengan metode ini maka sel yang mengalami apoptosis dapat ditemukan walaupun belum terjadi perubahan morfologis dan sangat mudah dibedakan dengan sel yang tidak mengalami apoptosis. Pada penelitian ini digunakan *methylgreen* sebagai *counterstain* yang dapat mewarnai inti sel, sehingga inti sel yang tidak mengalami apoptosis akan terlihat hijau. Hal ini akan mempermudah pengamatan dan hasil penghitungan dapat dibuat dalam bentuk persentase sehingga jumlah sel dalam kelompok sampel dapat dibandingkan dengan kelompok sampel yang lain.



BAB 7

KESIMPULAN

BAB 7

KESIMPULAN DAN SARAN

7.1 Kesimpulan

Berdasarkan hasil penelitian dapat ditarik kesimpulan sebagai berikut :

1. Paparan radiasi sinar γ dengan dosis 50 rad dapat meningkatkan apoptosis pada sel asinar kelenjar parotis mencit strain BALB/c jantan pada 24 dan 48 jam setelah paparan.
2. Kualitas peningkatan ekspresi p53 dan apoptosis pada sel asinar kelenjar parotis mencit strain BALB/c pada 48 jam setelah paparan radiasi ionisasi lebih rendah dibandingkan kualitas peningkatan pada 24 jam setelah paparan.
3. Dugaan peningkatan apoptosis sel asinar kelenjar saliva sebagai patogenesis xerostomia pada terapi radiasi semakin dapat diyakini kebenarannya.

7.2 Saran

Berdasarkan hasil penelitian maka dikemukakan saran sebagai berikut :

1. Perlu dilakukan penelitian yang mengungkap hubungan apoptosis pada sel asinar kelenjar saliva dan jumlah sekresi saliva
2. Perlu dilakukan tindakan pencegahan apoptosis pada sel asinar kelenjar saliva pada penderita yang akan diterapi radiasi ionisasi, dengan dasar patogenesis yang dipaparkan pada penelitian ini.



DAFTAR PUSTAKA

DAFTAR PUSTAKA

- Agarwal ML, Taylor WR, Chernov MV, Chernova OB, Strak GR, 1998, *The p53 network*, J Biol Chem 273 (1) pp.1-4
- Amerongen AVN ,1991. **Ludah dan kelenjar ludah, Arti bagi kesehatan gigi.** Alih bahasa Abyono, Yogyakarta: Gajah Mada University Press,
- Aranda-Anzaldo A, Orozco-Velasco F, Garcia-Villa E, Gariglio P, 1999. *p53 is a rate-limiting factor in repair of higher-order DNA structure.* **Biochem Biophys Acta Sep 3;1446(3);181-992.**
- Ashkenaszi A, Dixit VM, 1998. *Death receptor: Signaling and modulation.* **Science 281:1305-8**
- August M, Wang J, Plante D, Wang CC, 1996. *Complications associated with therapeutic neck radiation.* **J Oral Maxillofac Surg Dec;54(12):14009-15**
- Beer KT, 1998. *Campaign against radio-xerostomia.* **Ther Umsch Jul 55 (7) : 453-5**
- Bennett MR, 1999. *Mechanisms of p53-induced apoptosis.* **Biochem Pharmacol. Oct 1 ; 58 (7) : 1089-95**
- Burket LW, 1984. Changes associated with radiation. In **Burket's oral medicine diagnosis and treatment** ,ed. by M Lynch, 7th ed, Philadelphia : JB Lippincott Co,pp 275-80
- Burns TF, El-Deiry WS, 1999. *The p53 Pathway and Apoptosis*, **J Cell Phys 181:231-239**
- Bursch W, Kline L, Tenniswood M, 1990. *Determination of length of the histological stage of apoptosis in normal liver and altered hepatic foci of rats,* **Carcinogenesis(London) 11:847-53**
- Bushong SC, 1998. **Radiation protection.** New York: McGraw-Hill Co,pp29-37
- Carl W, 1995. *Oral complication of local and systemic cancer treatment.* **Curr Opin Oncol, Jul;7(4):320-4**
- Canman CE, Kastan MB, 1997, *Role of p53 in Apoptosis*, **Advances in Pharmacology**, Vol 41:429-450

- Canman CE, Lim DS, Cimprich KA, Taya Y, Tamai K, Sakaguchi K, Appella E, Kastan MB, Siliciano JD, 1998. *Activation of the ATM kinase by ionising radiation and phosphorylation of p53*. **Science**, Sep;281(5383):1677-9
- Chebab NH, Malikzay A, Stavridi ES, Halazonetis TD, 1999. *Phosphorylation of ser-20 mediates stabilization of human p53 in response to DNA damage*. **Cell Biology** Nov 96 (24);13777-82
- Choi JH, Ahn KS, Kim J, Hong YS, 2000. *Enhanced induction of bax gene expression in H460 and H1299 cells with the combined treatment of cisplatin and adenovirus mediated wt-p53 gene transfer*. **Exp Mol Med** Mar 31;332 (1) :238
- Coppes RP, Roffel AF, Zeilstra LJ, Vissink A, Konings AW, 2000. *Early radiation effects on muscarinic receptor-induced secretory responsiveness of parotid gland in freely moving rat*. **Radiat Res** Mar;153 (3): 339-46
- Costantinides P, 1994. **General Pathobiology**. Norwalk: Appleton and Lange, pp 255-61
- Cotran RS, Kumar V, Collins T, 1999, **Pathologic Basis of Disease**, 6th ed., Philadelphia: WB Saunders Co.
- Di Leonardo A, Linke SP, Clarkin K; Whal GM, 1994. *DNA Damage triggers a prolonged p53-dependent G1 arrest and long-term induction of Cip2 in normal human fibroblasts*, **Genes Dev** 1;8 (21):2540-51
- Eisbruch A, Ten Haken RK, Kim HM, Marsh LH, Ship JA, 1999. *Dose volume, and function relationships in parotid salivary glands following conformal and intensity-modulated irradiation of head and neck cancer*. **Int J Radiat Oncol Biol Phys** Oct 1;45 (3) :577-87.
- Epstein JB, Chin EA, Jacobsion JJ, Rishiraj B, Nhu Le, 1998. *Relationship between fluoride, cariogenic oral flora and salivary flow during radiation therapy*. **Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod**, 86:286-92
- Epstein JB, Emerton S, Kolbinson DA, Le ND, Phillips N, Stevenson-Morre P, Osoba D, 1999. *Quality of life and oral function following radiotherapy for head and neck cancer*. **Head Neck** Jan;21 (1) :1-11
- Eskes R, Desagher S, Antonsson B, Martinou JC, 2000. *Bid induces the oligomerization and insertion of bax into the outer mitochondrial membrane*. **Mol Cell Biol** Feb; 20 (3) :929-335

- Evan G, Littlewood T, 1998. *A matter of life and cell death*. **Science** 281;1317-19
- Fuks Z, Weichselbaum RR, 1995. *Radiation therapy*, in **The molecular basis of cancer**. Philadelphia: W B Saunders Co, pp 4001-8
- Green DR, John CR, 1998. *Mitochondria and apoptosis*. **Science** 281:1309-11
- Guchelaar HJ, Vermmes A, Meerwaldt JH, 1997. *Radiation-induced xerostomia: pathophysiology, clinical course and supportive treatment*. **Support Care Cancer** Jul;5 (4) :281-8
- Hengartner M, 1998. *Death by Crowd Control*. **Sciences** 281 : 1288-9
- Henrikson, 1994. *Increase in mast cells and hyaluronic acid correlates to radiation-induced damage and loss of acinar cells in salivary glands differ in radiation sensitivity*. **Br J Cancer** Feb ;69(2):320-6
- Hetts SW, 1998. *To die or not to die, an Overview of apoptosis and Its Role in disease*. **JAMA**, Jan, 28; 279(4):300-7
- Higgins JE, Kleinbaum AP, 1985 Miller P. **Introduction to randomized clinical trial, The Basics of randomized clinical trial with an emphasis on contraceptive research**. North Carolina: Family Health International Research Triangle Park.
- Jones NA, Turner J, McIwrath AJ, Brown R, Dive C, 1998. *Cisplatin- and paclitaxel-induce apoptosis of ovarian carcinoma cells and the relationship between bax and bak up regulation and the functional status of p53*. **Mol Pharmacol** May;53(5);819-26
- Jongmans W, Artuso M, Vuillaume M, Bresil H, Jackson SP, Hall J, 1996, *The role of ataxia telangiectasia and DNA-dependent protein kinase in p53-mediated cellular response to ionising radiation*, **Oncogen** Sep19;13(6):1133-8
- Kagawa S, Gu J, Swisher SG, Ji L, Roth JA, Lai D, Stephens LC, Fang B, 2000. *Anti tumor effect of adenovirus-mediated bax gene transfer on p53-sensitive and p53 resistant cancer line*. **Cancer Res** Mar 1;60 (5):1157-61
- Khanna KK, Keating KE, Kozlov S, Scott S, Gatei M, Hobson K, Taya Y, Gabrielli C, Chan D, Lees-Miller SP, Lavin MF, 1998. *ATM associates with and phosphorylates p53: mapping the region interaction*. **Nat Genet**, Dec;20(4):398-400

- Khosravi R, Maya R, Gottlieb T, Oren M, Shiloh Y, Shkedy D, 1999. *Rapid ATM-dependent phosphorylation of MDM2 precedes p53 accumulation in response to DNA damage*. **Cell Biol**, Dec,21; 96 (26):14973-7
- Kondo S, 1998. *Apoptotic repair of genotoxic tissue damage and the role of p-53 gene*. **Mutat Res** Jun,18 ;402(1-2) :311-9
- Kapoor M, Lozano G, 1998. *Functional activation of 53 via phosphorylation following DNA damage by UV but not γ radiation*. **Biochem**, March, 17 ;95 (6): 2834-7.
- Levine AJ, 1995. *Tumor suppressor genes*. in **The molecular basis of cancer**. Philadelphia: W B Saunders.Co, pp 86-98
- Martoprawiro SS,1996. **Peranan Patologi Anatomi dalam Menegakkan Diagnostik Penyakit: dengan teknik HE, Histokimia, Imunohistokimia, Papaniculoau dan MGG**, Surabaya, RSUD Dr.Sutomo, hal.10
- McCurrach ME, Connor TMF, Knudson M, Korsmeyer SJ, Lowe SW , 1997. *Bax-deficiency promotes drug resistance and ocogenic transformation by attenuating p53-dependent apoptosis*, **Cell Biology**, Vol 94: 2345-2349
- Moshe O, 1999. *Regulation of the p53 tumor suppressor protein*, **J Biol Chem** 274 (51) pp. 36031-4
- O`Connel AC, Redman RS, Evans RL, Ambudkar IS, 1999. *Radiation-induced progressive decrease in fluid secretion in rat submandibular glands is related to decrease acinar volume and not impaired calcium signaling*. **Radiat Res** Feb;151 (2):150-8.
- Paardekooper GM, Cammelli S, Zeilstra LJ, Coppes RP, Konings AW, 1998. *Radiation-induced apoptosis in relation to acute impairment of rat salivary gland function*. **Int J Radiat Biol** Jun;73 (6) :641-8
- Pearson AS, Spitz FR, Swisher SG, Kataoka M, Sarkiss MG, Meyn RE, McDonnells TJ, Cristinao RJ, Roth JA, 2000. *Up-regulation of the proapoptotic mediators Bax and bak after adenovirus-mediated p53 gene transfer in lung cancer cell*. **Clin Cancer Res** May;6 (3): 23-8
- Provenza DV, 1988. **Fundamental of oral histology and embryology**. Philadelphia:Lea & Febiger, pp 253-64
- Ross GM, 1999. *Induction of cell death by radiotherapy*. **Endocr Relat Cancer** Mar;6(1):41-4

- Rotman G, Shiloh Y, 1998. *ATM: from gene to function*. **Hum Mol Genet**;7(10):1555-63
- Rotman G, Shiloh Y, 1999. *ATM: a mediator of multiple responses to genotoxic stress*. **Oncogene**; Nov 1;18(45):6135-44
- Shaeard MA, Voittesek B, Janakova L, Kovarik J, Zaloudik J, 1997. *Up regulation of fas (CD95) in human p53 wild type cancer cells treated with ionizing radiation*. **Int. J. Cancer** Nov 27;73(5):757-62
- Shaftman T, Khanna KK, Kedar P, Spring K, Kozlov S, Yen T, Hobson K, Gatei M, Zhang N, Watters D, Egerton M, Shiloh Y, Kharbanda S, Kufe D, Lavin MF, 1997. *Interaction between ATM Protein and c-Abl in response to DNA damage*. **Nature** 29;387(6632):520-3
- Sirica AE, 1996. **Cellular and molecular pathogenesis**. Philadelphia:Lippincott-Raven, pp 3-14
- Skulachev VP, 1998. *Cytochrome C in apoptotic and antioxidant cascades*. **FEBS Lett** Feb 27;423(3) :275-80.
- Spijkerveet FKL, 1996. **Mukositis akibat radiasi**, judul asli *Irradiation mucositis, prevention and treatment*, alih bahasa Sumawita N, Jakarta: Widya Medika, hal. 6-7
- Steel RGD, Torrie H, 1995. **Prinsip dan Prosedur Statistika, Suatu Pendekatan Biometrik**, Edisi kedua, Jakarta, PT Gramedia Pustaka Utama, pp 168
- Suzuki K, Kodama S, Watanabe M, 1999. *Recruitment of ATM protein to double strand DNA irradiated with ionising radiation*. **J Biol Chem** Sep 3;274 (36):25571-5
- Teyssier F, Bay JO, Dionet C, Varrele P, 1999. *Cell cycle regulation after exposure to ionizing radiation*. **Bull Cancer**(Paris) Apr;86(4) 345-57
- Thornberry AN, Lazebnik Y, 1998. *Caspase: Enemy within*. **Science** 281:1312-16
- Wallace SS, 1998. *Enzymatic processing of radiation-induced free radical damage in DNA*, **Radiat Res**, Nov;150 (5 Suppl):S60-79
- Wani MA, Zhu QZ, El-Mahdy M, Wani AA, 1999. *Influences of p53 tumor suppressor protein on bias of DNA repair and apoptotic response in human cells*. **Carcinogenesis** May;20 (5):765-72

- Wang X, Matsumoto H, Okaichi K, Ohnishi T, 1996^a. *p53 accumulation in various organs of rats after whole-body exposure to low dose x-ray irradiation. Anticancer Res Jul-Aug;16(4A):1671-4*
- Wang X, Matsumoto H, Takahashi A, Nakano T, Okaichi K, Ihara M, Ohnishi T, 1996^b. *p53 accumulation in the organs of various organs of low dose x-ray irradiated mice. Cancer Lett Jun 24 ;104 (1) :79-84*
- Zainuddin M, 1999. **Metodologi Penelitian**. Surabaya: Airlangga University Press
- Zeilstra LJ, Vissink A, Konninga AW, Coppes RP, 2000. *Radiation induced cell loss in rat submandibular gland and its relation to gland function. Int J Radiat Biol Mar;76 (30) 419-29.*
- Yan J, Khanna KK, Lavin MF, 2000. *Defective radiation signal transduction in ataxia telangiectasia cells. Int J Radiat Biol Aug;776(8) :1025-35*
- Yarnold J, 1997. *Molecular Aspect of cellular response to radiotherapy. Radiother. Oncol Jul;44(1):1-7*



LAMPIRAN

Lampiran 1. Pengitungan Besar Sampel

Ulangan	Kontrol	Perlakuan
1	4.4	8.2
2	3.8	8.4
3	2.6	7.8
4	2.8	7.6
5	1.4	7.6
6	3.4	8.2
Jumlah	18.4	47.8
Rerata	3.066667	7.966667
Stan. Dev	1.0482	0.34448

$$n = \frac{1}{1-f} \times \frac{2(Z\alpha + Z\beta)^2 Sc^2}{(\bar{X}_c - \bar{X}_l)^2}$$

$$f = 0,05$$

$$Z\alpha = 1,96$$

$$Z\beta = 1,28$$

$$= 1,053 \times \frac{2(1,96 + 1,28)^2 \cdot (1,0482)^2}{(3,0667 - 7,9667)^2}$$

$$= 1,053 \times \frac{20,995 \times 1,0987}{24,01}$$

$$= 1,053 \times 0,9607$$

$$= 1,01165$$

Penghitungan diatas menunjukkan besar sampel minimum yang harus dipenuhi oleh peneliti. Pada penelitian ini peneliti menggunakan besar sampel = 6. Maka penelitian ini sangat memenuhi persyaratan besar sample tersebut.

Lampiran 2. Bahan dan Instrumen Penelitian

Bahan Penelitian :

1. Mencit jantan strain BALB/c dengan berat \pm 25 gram
2. Pakan mencit : Pur Q dan Minum Mencit: air PDAM.
3. *S7101 Apoptag® Plus Peroxidase In Situ Apoptosis Detection Kit* dari Intergen
4. *Kit Anti p53 sc-6243 Santa Cruz Biotechnology*
5. *Protein Digesting Enzyme*
6. *Hematoxilin*
7. *Deionized water (dH₂O)*
8. *Xylene*
9. Ethanol: absolut, 95%, 70% dilarutkan dalam dH₂O
10. *Slide mounting medium*
11. *Polylysin*
12. 10% (v:v) *buffer formalin* netral
13. PBS (50mM *sodium phosphat*, pH7,4, 200nM NaCl)
14. *Hydrogen Peroxide* 30%
15. 0.5% (w:v) *methyl green*, bebas dari kristal violet
16. 10mM *citrat buffer*, pH6.0
17. Kertas tissue

Instrumen Penelitian

1. Kandang Mencit dan perlengkapannya.
2. Seperangkat alat bedah.
3. Alat fixasi mencit, tabung plastik bekas kemasan film, selotip, lidi
4. Alat Terapi Radiasi dengan perlengkapannya
5. Mikroskop Cahaya (dengan lensa obyektiv 20 dan 40 X)
6. *Obyek Glass dan Cover glass*
7. *Mikrowave Oven*
8. Mikro pipet beserta *yellow tip*.
9. *Vortex*
10. *Refrigerator dan freezer*
11. *Glass coplin jar*
12. *Humidified chamber*
13. Inkubator 37°C

Lampiran 3. Teknik pemrosesan jaringan dengan teknik rutin untuk pembuatan *parafin embeded tissue*

1. Melakukan proses fiksasi, *dehidrasi*, *clearing* dan impregnasi dengan mencelupkan jaringan kedalam larutan seperti tertera dibawah ini sesuai waktu yang ditentukan.

Tabung	Larutan	Waktu	Proses
1.	Formalin Buffer 10%	2 jam	Fikasasi
2.	Alkohol 70%	1 jam	Dehidrasi
3.	Alkohol 80%	2 jam	Dehidrasi
4.	Alkohol 95%	2 jam	Dehidrasi
5.	Alkohol 96% + crusi	2 jam	Dehidrasi
6.	Alkohol 96% + crusi	1 jam	Dehidrasi
7.	Alkohol 96% + crusi	2 jam	Dehidrasi
8.	Xylol	1 jam	Clearing
9.	Xylol	2 jam	Clearing
10.	Xylol	2 jam	Clearing
11.	Parafin Cair (58°- 60° C)	2 jam	Impregnasi
12.	Parafin Cair (58°- 60° C)	2 jam	Impregansi

2. *Embedding* dan pemotongan mikroskopis dengan mikrotom

- Alat cetak yang terbuat dari logam berbentuk siku-siku disusun diatas permukaan kaca. Alat dan alas kaca diolesi gliserin untuk

mempermudah pemisahan alat cetak dengan blok parafin yang sudah beku dan kaca.

- Parafin cair dalam dua wadah, yaitu parafin untuk bahan *embedding* dan parafin sebagai media penyesuaian temperatur yang akan ditanam.
- Parafin cair pada tempat pertama dituangkan kedalam alat cetak hingga penuh pada permukaannya, lalu jaringan ditanam pada posisi yang sesuai dan bagian permukaan jaringan yang menempel pada kaca diusahakan rata.
- Bila parafin sudah cukup keras, alat cetak dilepaskan dan blok parafin diberi label dan siap disayat.
- Blok parafin ditempelkan pada alat pemegangnya yang berupa lempengan logam yang sudah dipanasi. Perhatikan sisi blok mana yang akan dipotong, kemudian didinginkan samapai suhu kamar agar melekat erat.
- Pisau mikrotom dipasang pada pegangannya, membentuk sudut $5-10^{\circ}$. Pisau harus tajam dan permukaannya harus benar-benar rata,
- *Water bath* dipersiapkan dengan mengatur suhu air dibawah titik leleh parafin ($\pm 48^{\circ}\text{C}$)
- Blok yang sudah menempel pada pemegangnya dipasang pada mikrotom dan siap dilakukan pemotongan tipis dengan ketebalan yang dikehendaki, biasanya 4-8 mikron.

- Hasil pemotongan berupa pita tipis dengan hati-hati dipindahkan kedalam *water bath* agar sayatan jaringan dapat mengembang dengan baik.
- Sayatan diseleksi dan dipindahkan ke atas kaca obyek yang telah diolesi polilisin sebagai bahan perekat dan diberi label sesuai label pada blok.
- Sediaan dibiarkan kering dan dimasukkan kedalam oven dengan suhu 58°C - 60°C selama 30 menit dan jaringan siap dicat.



Lampiran 4. Dasar Teknologi, Prinsip Kerja dan Prosedur pemrosesan sediaan dengan S7101 Apoptag Plus Peroxidase In Situ Apoptosis Detection Kit

1. Dasar Teknologi

Dasar teknologi Apoptag adalah TUNEL (*terminal deoxyuridine nucleotide end labelling*) Assay. Kerusakan strand DNA dideteksi dengan melabel ujung bebas 3'-OH secara enzimatik dengan nukleotida yang dimodifikasi.

Ujung DNA yang terbentuk dari fragmentasi DNA ini ada pada inti yang mengalami apoptosis maupun *apoptotic bodies*. Sedangkan pada inti yang normal maupun yang berproliferasi, dimana terdapat ujung 3'-OH dalam jumlah yang tidak signifikan tidak tercatat oleh kit.

Kit Apoptag mendeteksi *single strand break* maupun *double strand break* yang berhubungan dengan apoptosis. Kerusakan DNA yang disebabkan oleh obat tidak dapat dideteksi oleh TUNEL Assay kecuali bila ada respons apoptotik. Sebagai tambahan teknik ini dapat mendeteksi tahap awal apoptosis pada saat terjadi kondensasi kromatin dan kerusakan strand DNA masih sedikit, sebelum terjadi perubahan morfologis pada inti.

2. Prinsip Metode Apoptag

Reagen pada Apoptag dirancang untuk melabel ujung 3'-OH secara in situ dengan rangkaian nukleotida pendek (oligomer) yang terdiri dari nukleotida yang secara kimiawi dilabel dan nukleotida yang tidak

dilabel yang disusun secara acak. Label yang digunakan yaitu *digoxigenin* untuk metode *indirect* dan *fluorecein* untuk *direct*.

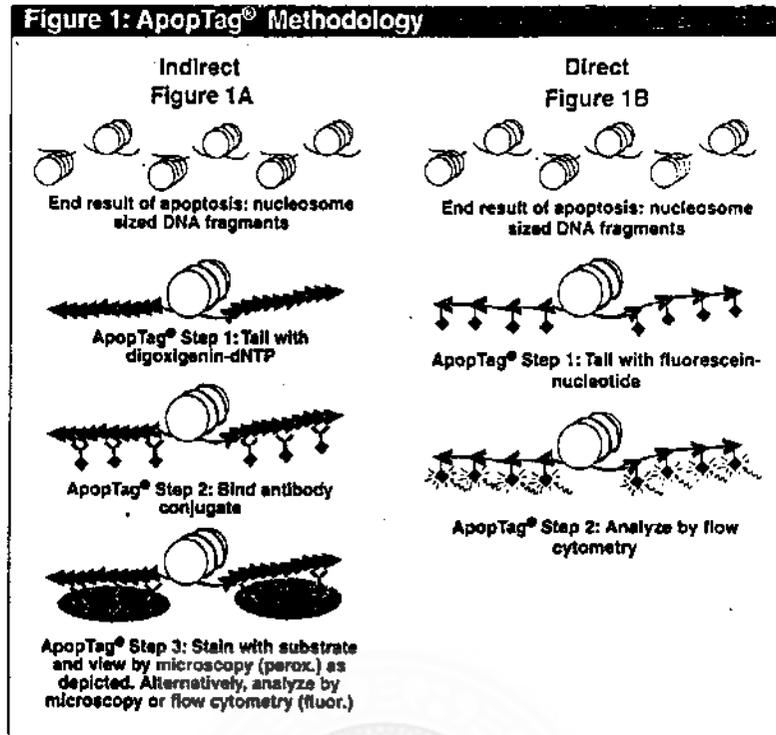
Rangkaian nukleotida yang terdapat pada *Reaction Buffer* secara enzimatik ditambahkan pada DNA dengan bantuan enzim *terminal deoxynucleotidyl transferase* (TdT). TdT mengkatalisis penambahan dari nukleotida triphosphat ke ujung 3'-OH DNA baik pita tunggal maupun pita ganda. Rasio antara nukleotida yang dilabel dan tidak dilabel pada Kit Apoptag dibuat optimal sehingga dapat memicu ikatan antibodi anti digoxigenin atau memperkecil *self quenching fluorescein*. Panjang dari oligomer yang ditambahkan tidak ditentukan/diukur.

- Metode Direct

Setelah ujung 3-OH diberi nukleotida yang mengandung fluorescein langsung dapat dimati dengan flow cytometri.

- Metode Indirect

Fragmen DNA yang telah dilabel kemudian diikat dengan antibody anti digoxigenin yang kemudian dikonjugasikan dengan molekul fluorescein, peroxidase atau rhodamine. Pada penelitian ini akan digunakan *S7101 Apoptag Plus Peroxidase In Situ Apoptosis Detection Kit* yang menggunakan peroxidase sehingga dapat dilihat dengan mikroskop cahaya.



Gambar Metode Apoptag Plus Peroxidase In Situ Apoptosis Detection Kit. (diambil dari The complete ApopTag Manual)

3. Prosedur pemrosesan sediaan dengan S7101 Apoptag Plus Peroxidase In Situ Apoptosis Detection Kit

Jaringan diproses sampai dalam bentuk blok parafin dengan pemrosesan rutin.

1. Deparafinisasi jaringan

- a. Spesimen dicuci tiga kali dengan *Xylene* masing-masing selama lima menit.
- b. Cuci spesimen dua kali dengan etanol absolut masing-masing selama lima menit
- c. Cuci spesimen dengan etanol 95% dan satu kali dengan etanol 70% masing-masing tiga menit.
- d. Spesimen dicuci dengan PBS selama lima menit.

2. Persiapan pemrosesan jaringan
 - a. Teteskan proteinase K (20 μ g/ml) langsung pada spesimen (60 μ /5 cm²) selama lima belas menit. Inkubasi dalam 37^oC
 - b. Cuci spesimen dua kali dengan dH₂O dalam coplin jar masing-masing dua menit.
3. Menghilangkan *endogenous peroxidase*.
 - a. Teteskan 3% H₂O₂ PBS selama lima menit pada suhu kamar.
 - b. Cuci spesimen dua kali dengan PBS masing-masing selama dua menit dalam *coplin jar*.
4. Gunakan *equibration buffer*.
 - a. Singkirkan cairan di sekitar potongan jaringan dengan kertas pengering.
 - b. Teteskan 75 μ l *equibration buffer* langsung pada spesimen.
 - c. Inkubasi paling sedikit sepuluh menit pada suhu kamar.
5. Gunakan *Working Strength TdT Enzyme*.
 - a. Singkirkan cairan di sekitar potongan jaringan dengan kertas pengering.
 - b. Segera teteskan *Working Strength TdT Enzyme* pada potongan jaringan sebanyak 55 μ l/5cm².
 - c. Inkubasi selama satu jam pada suhu 37 C dalam wadah yang lembab.
6. Gunakan *Stop/Wash buffer*.

- a. Letakkan spesimen dalam *coplin jar* yang berisi *Working Strength Stop/Wash Buffer*, guncangkan selama lima belas detik kemudian diinkubasi selama sepuluh menit pada suhu kamar
 - b. Keluarkan *Anti-Digoxigenin peroksidase Conjugate* dari tempat penyimpanan dan hangatkan pada suhu kamar.
7. Gunakan *Anti Digoxigenin Peroxidase Conjugate*
- a. Cuci spesimen sebanyak empat kali dengan PBS dalam *coplin jar* masing-masing selama 2 menit pada suhu kamar
 - b. Keringkan cairan diantara potongan jaringan dengan kertas pengering.
 - c. Teteskan *Anti-Digoxigenin Peroxidase Conjugate* pada sediaan, gunakan kira-kira $65\mu\text{l}/5\text{cm}^2$ dari permukaan spesimen.
 - d. Inkubasi dalam tempat yang lembab selama tiga puluh menit pada suhu kamar.
8. Cuci dalam larutan PBS
- a. Cuci spesimen sebanyak empat kali dengan PBS dalam *coplin jar* masing-masing selama dua menit pada suhu kamar.
 - b. Sementara mencuci sediaan, disiapkan *Working Strength Peroxidase Substrat*
9. Pemberian warna pada sediaan dengan *Peroxidase Substrat*
- a. Hilangkan cairan diantara potongan jaringan secara-hati-hati dengan kertas pengering.
 - b. Teteskan *Peroxidase Substrat* secukupnya sampai menutupi seluruh permukaan jaringan ($75\mu\text{l}/5\text{cm}^2$)

- c. Biarkan selama sepuluh menit pada suhu kamar
- d. Untuk memonitor timbulnya warna dapat dilihat dengan mikroskop cahaya

10. Cuci Spesimen

- a. Cuci spesimen tiga kali dengan dH₂O dalam *coplin jar* masing-masing selama satu menit
- b. Slide diinkubasi dengan dH₂O dalam *coplin jar* selama lima menit pada suhu kamar.

11. Pemberian *counterstain* spesimen

- a. Oleskan Hematoxylin selama tigapuluh detik pada suhu kamar
- b. Cuci spesimen dengan dH₂O dalam *coplin jar* masing-masing selama satu menit

12. *Mount specimen*

- a. Keringkan spesimen dengan *xylene*
- b. Hilangkan cairan diantara sediaan dengan kertas pengering

13. Amati di bawah mikroskop.

Lampiran 5. Prosedur Pemeriksaan p53 dengan Kit p53 ImunoCruz Staining System dari Santa Cruz Biotechnology

1. Persiapan sampel : deparafinisasi dengan *xylene* sebanyak 3 kali masing-masing 5 menit diteruskan dengan rehidrasi dengan etanol 100% 2 kali masing-masing 10 menit dan etanol 95% 2 kali masing-masing 10 menit. Bilas dalam dH₂O selama 1 menit pada *stir plate*. Hisap kelebihan cairan di *object glass* dengan kertas tissue;
2. Untuk membuka antigen/epitope, tempatkan *slide* dalam container dan berikan 10mM *sodium citrate buffer*, pH6.0. Panaskan pada suhu 95°C selama 5 menit. Lanjutkan dengan *fresh buffer* dan panaskan pada suhu 95°C selama 5 menit. Biarkan *slide* dingin dalam *buffer* selama 20 menit. Cuci dengan dH₂O tiga kali masing-masing 2 menit. Aspirasi kelebihan cairan pada *slide*.
3. Untuk mengeluarkan *endogenous peroxidase*, spesimen diinkubasi selama 5 menit dengan peroksidase blok sebanyak 1-3 tetes. Aspirasi kelebihan cairan pada *slide*.
4. Segera setelah itu tambahkan 1-3 tetes antibody primer yang telah diencerkan (siap pakai) secukupnya sampai bisa menutup seluruh jaringan. Inkubasi selama 2 jam. Bilas dengan PBS, kemudian cuci dengan PBS 2 kali masing-masing selama 2 menit pada *stir plate*. Aspirasi kelebihan cairan pada *slide*.
5. Beri 1-4 tetes antibody sekunder *Biotinylated* pada tiap *slide*. Inkubasi selama 30 menit. Bilas kemudian cuci dengan PBS pada *stir plate* dua

- kali masing-masing selama 2 menit. Aspirasi kelebihan cairan pada *slide*.
6. Inkubasi spesimen selama 30 menit dengan 1-3 tetes *HRP Streptavidin Complex*. Cuci dengan PBS 2 kali masing-masing 2 menit pada stir plate. Aspirasi kelebihan cairan pada *slide*.
 7. Selama masa inkubasi diatas persiapkan HRP substrat. Untuk 15-20 *slide*, Campurkan dalam botol yang telah disediakan 1,6 ml dH₂O, 5 tetes 10X substrat buffer, 1 tetes DAB Chromogen dan 1 tetes 50 X *peroxidase substrat*.
 8. Beri 1-3 tetes substrat HRP pada tiap *slide* . Biarkan sampai dengan tampak cahaya kecoklatan (30 detik – 10 menit) meskipun bila diperlukan bisa sampai dengan 20 menit. Periksa dibawah mikroskop, bila perlu tambahkan HRP substrat dan teruskan inkubasi. Bilas dengan dH₂O dan teruskan cuci dengan dH₂O selama 2 menit pada stir plate.
 9. *Counterstain slide* dengan *Gill's formulation hematoxylin*. Inkubasi selama 5-10 detik. Bilas segera dengan dH₂O beberapa kali.
 10. Dehidrasi jaringan sebagai berikut : 2 kali 95% etanol masing-masing selama 10 detik, 2 kali 100% etanol masing-masing 10 detik dan 3 kali *xylene* masing-masing selama 10 detik. Bersihkan kelebihan *xylene* dari tepi *slide*.
 11. Beri satu-dua tetes larutan *muonting* permanen pada *slide* dan tutup dengan *cover glass*. Amati dengan mikroskop cahaya.

**Lampiran 6 . Hasil Penghitungan Sel Asinar Kelenjar Parotis Mencit
Strain BALB/c Jantan yang Mengalami Apoptosis Per
100 sel.**

Perlakuan	Ulangan	LP1	LP2	LP3	LP4	LP5	Rerata
K24	1	6	0	3	4	6	3.8
	2	0	0	5	7	4	3.2
	3	6	4	0	6	3	3.8
	4	3	4	5	5	3	4
	5	4	6	2	3	4	3.8
	6	3	4	2	6	8	4.6
P24	1	23	23	32	29	24	26.2
	2	22	21	19	33	32	25.4
	3	32	33	30	29	30	30.8
	4	29	34	37	35	23	31.6
	5	40	23	21	26	24	26.8
	6	23	22	25	26	20	23.2
K48	1	12	0	4	0	6	4.4
	2	5	6	0	4	4	3.8
	3	2	0	6	2	3	2.6
	4	1	5	7	0	1	2.8
	5	2	2	0	3	0	1.4
	6	3	4	1	9	0	3.4
P48	1	6	8	13	5	9	8.2
	2	9	6	11	6	10	8.4
	3	7	8	5	12	7	7.8
	4	6	9	6	9	8	7.6
	5	14	3	10	4	7	7.6
	6	17	12	5	3	4	8.2

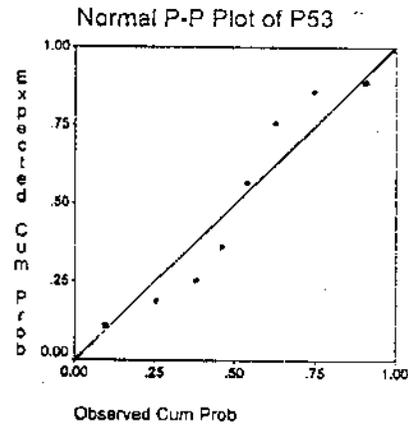
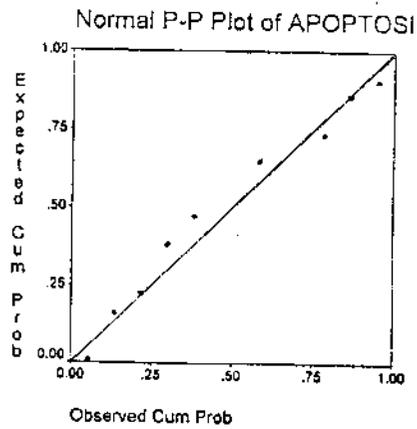
Lampiran 7. Hasil Penghitungan Ekspresi p53 Sel Asinar Kelenjar

Parotis Mencit Strain BALB/c Jantan per 100 sel

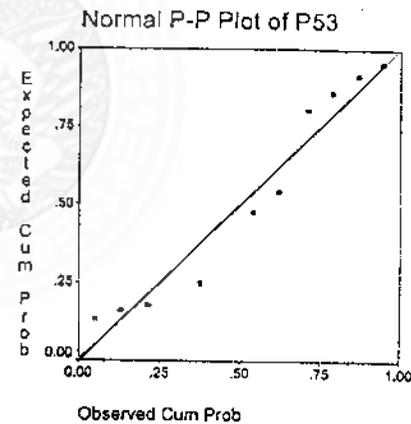
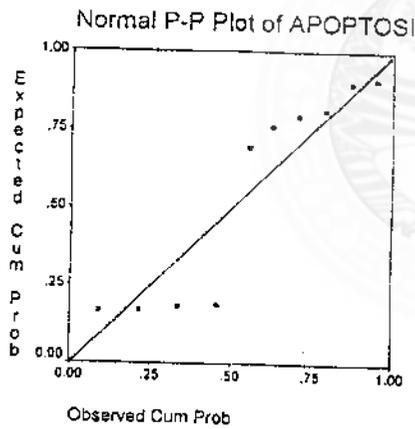
Perlakuan	Ulangan	LP1	LP2	LP3	LP4	LP5	Rerata
K24	1	16	5	3	0	7	6.2
	2	7	8	5	3	3	5.2
	3	5	3	1	5	12	5.2
	4	6	8	2	3	9	5.6
	5	5	8	6	4	6	5.8
	6	6	8	9	3	2	5.6
P24	1	27	27	24	25	34	27.4
	2	31	27	28	24	33	28.6
	3	40	32	34	44	29	35.8
	4	37	43	37	40	45	40.4
	5	25	44	43	40	38	38
	6	36	30	39	27	39	34.2
K48	1	9	13	4	9	4	7.8
	2	13	7	10	5	4	7.8
	3	6	9	8	7	10	8
	4	4	6	12	6	9	7.4
	5	7	9	6	9	9	8
	6	5	8	5	7	9	6.8
P48	1	17	23	29	23	23	23
	2	19	13	25	23	23	20.6
	3	23	14	16	26	19	19.6
	4	21	17	30	18	19	21
	5	26	17	25	24	23	23
	0	32	23	18	20	22	23

Lampiran 8 : Hasil Uji Normalitas dan Homogenitas Data.

1. Uji Normalitas Probability Plot Kelompok Perlakuan



2. Uji Normalitas Probability Plot Kelompok Kontrol



3. Uji Homogenitas Data

Levene's Test of Equality of Error Variances^a

	F	df1	df2	Sig.
P53	10.259	3	20	.000
APOPTOSI	9.423	3	20	.000

Tests the null hypothesis that the error variance of the dependent variable is equal across groups.

a. Design: Intercept+KELOMPOK

Lampiran 9. Hasil Uji Manova dan Anova pada Kelompok Sampel.

Between-Subjects Factors

	Value Label	N
KELOMPOK	1 KONTROL 1	6
	2 PERLAKUAN 1	6
	3 KONTROL 2	6
	4 PERLAKUAN 2	6

Descriptive Statistics

	KELOMPOK	Mean	Std. Deviation	N
P53	KONTROL 1	5.6000	.3795	6
	PERLAKUAN 1	34.0667	5.1562	6
	KONTROL 2	7.6333	.4633	6
	PERLAKUAN 2	21.7000	1.4953	6
	Total	17.2500	12.0339	24
APOPTOSI	KONTROL 1	3.8667	.4502	6
	PERLAKUAN 1	27.3333	3.2439	6
	KONTROL 2	3.0667	1.0482	6
	PERLAKUAN 2	7.9667	.3445	6
	Total	10.5583	10.2020	24

Multivariate Tests^c

Effect		Value	F	Hypothesis df	Error df	Sig.
Intercept	Pillai's Trace	.984	587.321 ^a	2.000	19.000	.000
	Wilks' Lambda	.016	587.321 ^a	2.000	19.000	.000
	Hotelling's Trace	61.823	587.321 ^a	2.000	19.000	.000
	Roy's Largest Root	61.823	587.321 ^a	2.000	19.000	.000
KELOMPOK	Pillai's Trace	1.780	53.854	6.000	40.000	.000
	Wilks' Lambda	.005	86.149 ^a	6.000	38.000	.000
	Hotelling's Trace	44.977	134.932	6.000	36.000	.000
	Roy's Largest Root	40.887	272.579 ^b	3.000	20.000	.000

a. Exact statistic

b. The statistic is an upper bound on F that yields a lower bound on the significance level.

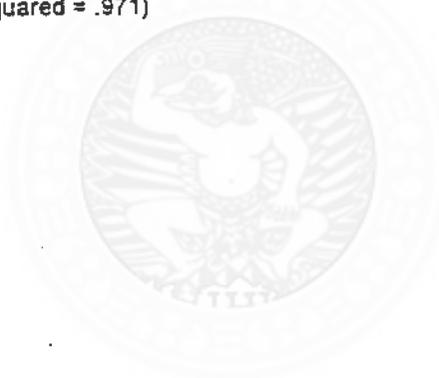
c. Design: Intercept+KELOMPOK

Tests of Between-Subjects Effects

Source	Dependent Variable	Type III Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Corrected Model	P53	3184.833 ^a	3	1061.611	145.519	.000
	APOPTOSI	2334.125 ^b	3	778.042	260.592	.000
Intercept	P53	7141.500	1	7141.500	978.913	.000
	APOPTOSI	2675.482	1	2675.482	896.109	.000
KELOMPOK	P53	3184.833	3	1061.611	145.519	.000
	APOPTOSI	2334.125	3	778.042	260.592	.000
Error	P53	145.907	20	7.295		
	APOPTOSI	59.713	20	2.986		
Total	P53	10472.240	24			
	APOPTOSI	5069.320	24			
Corrected Total	P53	3330.740	23			
	APOPTOSI	2393.838	23			

a. R Squared = .956 (Adjusted R Squared = .950)

b. R Squared = .975 (Adjusted R Squared = .971)



Lampiran 10 . Hasil Uji LSD antar Kelompok Sampel

Multiple Comparisons

Dependent Variable		(I) KELOMPOK	(J) KELOMPOK	Mean Difference (I-J)	Std. Error	Sig.	95% Confidence Interval		
							Lower Bound	Upper Bound	
P53	LSD	KONTROL 1	PERLAKUAN 1	-28,4667*	1,5594	.000	-31,7198	-25,2138	
			KONTROL 2	-2,0333	1,5594	.207	-5,2862	1,2196	
			PERLAKUAN 2	-18,1000*	1,5594	.000	-19,3529	-12,8471	
		PERLAKUAN 1	KONTROL 1	28,4667*	1,5594	.000	25,2138	31,7196	
			KONTROL 2	25,4333*	1,5594	.000	23,1804	29,6862	
			PERLAKUAN 2	12,3667*	1,5594	.000	9,1138	15,6198	
		KONTROL 2	KONTROL 1	2,0333	1,5594	.207	-1,2196	5,2862	
			PERLAKUAN 1	-26,4333*	1,5594	.000	-29,6862	-23,1804	
			PERLAKUAN 2	-14,0667*	1,5594	.000	-17,3196	-10,8138	
		PERLAKUAN 2	KONTROL 1	16,1000*	1,5594	.000	12,8471	19,3529	
			PERLAKUAN 1	-12,3667*	1,5594	.000	-15,6196	-9,1138	
			KONTROL 2	14,0667*	1,5594	.000	10,8138	17,3196	
	Tamhane	KONTROL 1	PERLAKUAN 1	KONTROL 2	-28,4667*	1,5594	.000	-37,2749	-19,6584
				PERLAKUAN 2	-2,0333*	1,5594	.000	-2,8387	-1,2279
			PERLAKUAN 1	KONTROL 1	28,4667*	1,5594	.000	19,6584	37,2749
				KONTROL 2	25,4333*	1,5594	.000	17,6379	35,2288
			KONTROL 2	KONTROL 1	2,0333*	1,5594	.000	3,8370	20,8963
				PERLAKUAN 1	-26,4333*	1,5594	.000	-35,2288	-17,6379
		PERLAKUAN 2	KONTROL 1	PERLAKUAN 1	-14,0667*	1,5594	.000	-18,5324	-11,6009
				PERLAKUAN 2	16,1000*	1,5594	.000	13,6111	18,5889
			PERLAKUAN 1	KONTROL 1	-12,3667*	1,5594	.000	-20,8963	-3,8370
				KONTROL 2	14,0667*	1,5594	.000	11,6009	16,5324
			KONTROL 2	KONTROL 1	-8,0000	.9976	.432	-12,810	-3,190
				PERLAKUAN 1	23,4667*	.9976	.000	21,3857	25,5476
APOPTOSI	LSD	KONTROL 1	KONTROL 2	.8000	.9976	.432	-1,2810	2,8810	
			PERLAKUAN 2	-4,1000*	.9976	.001	-6,1810	-2,0190	
			PERLAKUAN 1	23,4667*	.9976	.000	21,3857	25,5476	
		PERLAKUAN 1	KONTROL 2	24,2667*	.9976	.000	22,1857	26,3476	
			PERLAKUAN 2	19,3667*	.9976	.000	17,2857	21,4476	
			KONTROL 2	-8,0000	.9976	.432	-2,8810	1,2810	
		KONTROL 2	PERLAKUAN 1	-24,2667*	.9976	.000	-26,3476	-22,1857	
			PERLAKUAN 2	-4,9000*	.9976	.000	-6,9810	-2,8190	
			PERLAKUAN 2	4,1000*	.9976	.001	2,0190	5,1810	
		PERLAKUAN 2	PERLAKUAN 1	-19,3667*	.9976	.000	-21,4476	-17,2857	
			KONTROL 2	4,9000*	.9976	.000	2,8190	6,9810	
			KONTROL 1	-23,4667*	.9976	.000	-28,9680	-17,9653	
	Tamhane	KONTROL 1	PERLAKUAN 1	KONTROL 2	.8000	.9976	.569	-.9051	2,5051
				PERLAKUAN 2	-4,1000*	.9976	.000	-4,8876	-3,3324
			PERLAKUAN 1	KONTROL 1	23,4667*	.9976	.000	17,9653	29,9680
				KONTROL 2	24,2667*	.9976	.000	18,9284	29,6049
			KONTROL 2	PERLAKUAN 1	19,3667*	.9976	.000	13,8428	24,8906
				KONTROL 1	-8,0000	.9976	.569	-2,5051	.9051
		PERLAKUAN 2	KONTROL 1	PERLAKUAN 1	-24,2667*	.9976	.000	-29,8049	-18,9284
				PERLAKUAN 2	-4,9000*	.9976	.000	-5,8235	-3,1765
			KONTROL 2	KONTROL 1	4,1000*	.9976	.000	3,3324	4,6578
				PERLAKUAN 1	-19,3667*	.9976	.000	-24,8906	-13,8428
			PERLAKUAN 2	KONTROL 2	4,9000*	.9976	.000	3,1765	6,6235

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

Lampiran 11. Hasil Uji Manova dan Anova pada Data Selisih Perilaku dan Kontrol.

Between-Subjects Factors

		Value Label	N
Perubahan pemberian radiasi	1	24 JAM	6
	2	48 JAM	6

Descriptive Statistics

	Perubahan	Mean	Std. Deviation	N
DP53	24 JAM	28.4667	5.2363	6
	48 JAM	14.0667	1.7098	6
	Total	21.2667	8.3871	12
D_APOP	24 JAM	23.4667	3.3530	6
	48 JAM	4.9000	.7874	6
	Total	14.1833	9.9703	12

Levene's Test of Equality of Error Variances^a

	F	df1	df2	Sig.
DP53	5.722	1	10	.038
D_APOP	6.660	1	10	.027

Tests the null hypothesis that the error variance of the dependent variable is equal across groups.

a. Design: Intercept+GROUP

Multivariate Tests^b

Effect		Value	F	Hypothesis df	Error df	Sig.
Intercept	Pillai's Trace	.981	233.954 ^a	2.000	9.000	.000
	Wilks' Lambda	.019	233.954 ^a	2.000	9.000	.000
	Hotelling's Trace	51.990	233.954 ^a	2.000	9.000	.000
	Roy's Largest Root	51.990	233.954 ^a	2.000	9.000	.000
GROUP	Pillai's Trace	.946	78.473 ^a	2.000	9.000	.000
	Wilks' Lambda	.054	78.473 ^a	2.000	9.000	.000
	Hotelling's Trace	17.438	78.473 ^a	2.000	9.000	.000
	Roy's Largest Root	17.438	78.473 ^a	2.000	9.000	.000

a. Exact statistic

b. Design: Intercept+GROUP

Tests of Between-Subjects Effects

Source	Dependent Variable	Type III Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Corrected Model	DP53	622.080 ^a	1	622.080	41.005	.000
	D_APOP	1034.163 ^b	1	1034.163	174.356	.000
Intercept	DP53	5427.253	1	5427.253	357.747	.000
	D_APOP	2414.003	1	2414.003	406.992	.000
GROUP	DP53	622.080	1	622.080	41.005	.000
	D_APOP	1034.163	1	1034.163	174.356	.000
Error	DP53	151.707	10	15.171		
	D_APOP	59.313	10	5.931		
Total	DP53	6201.040	12			
	D_APOP	3507.480	12			
Corrected Total	DP53	773.787	11			
	D_APOP	1093.477	11			

a. R Squared = .804 (Adjusted R Squared = .784)

b. R Squared = .946 (Adjusted R Squared = .940)

