

EVALUASI APOPTOSIS SEL ODONTOBLAS AKIBAT PAPARAN RADIASI IONISASI

Supriyadi

Laboratorium Radiologi Kedokteran Gigi Fakultas Kedokteran Gigi Universitas Jember

Keywords:

Ionizing radiation;
Apoptosis;
Odontoblast

Abstract

Ionizing radiation that is commonly used in the treatment of head and neck cancer can result in multiple effects, such as cell death (apoptotic or necrotic) and malignant transformation. The purpose of this study was to show in vivo the effect of ionizing radiation on odontoblasts. The experimental laboratory study applied the post-test control group design. The test sample consisted of 24 healthy male Wistar rats, 3–4 month of age and 150–200g in weight. The rats were divided into 4 groups of 6 rats each, subjected to irradiation doses of 0 rad, 100 rad, 200 rad and 400 rad. The cobalt 60 irradiation source was applied to the head of each rat. All animals were sacrificed 24 hours after radiation exposure, and the lower incisivus were taken for histopathological specimen processing. The apoptotic status was evaluated by using the TUNEL Assay method. The apoptotic odontoblasts were counted under light microscope. The fraction of apoptotic cells were taken as the mean count from two sides (labial and palatal) of the teeth. The data were statistically analyzed using one-way Anova and Least Significant Different Test ($\alpha = 0.05$). The results showed that the fraction of apoptotic odontoblasts was 5.15% for 0 rad, 12.72% for 100 rad, 24.32% for 200 rad and 15.22% for 400 rad irradiation. There was a significant difference in the apoptotic percentage of odontoblasts among the four groups ($p < 0.05$). In conclusion, the highest fraction of apoptotic odontoblasts was found after a single 200 rad dose.

Pendahuluan

Penggunaan radiasi ionisasi di kedokteran terus meningkat baik untuk tujuan diagnosis maupun terapi. Penggunaan radiasi pengion saat ini juga tidak terbatas pada bagian radiologi saja tetapi juga pada pelayanan kesehatan lain di rumah sakit, seperti bagian penyakit dalam, unit gawat darurat dan bagian kandungan. Di bidang kedokteran gigi, radiasi ionisasi (sinar x) terutama digunakan untuk tujuan dental-radiodiagnosis, sedangkan untuk tujuan radioterapi sering digunakan untuk pengobatan kanker kepala dan leher yang insidensinya juga cukup tinggi.^{1,2} Penggunaan radiasi ionisasi mempunyai efek biologis yang merugikan oleh karena efek biologis radiasi ini biasanya tidak terbatas pada sel sasaran radioterapi saja, tetapi juga mengenai sel normal di sekitarnya. Radioterapi kanker di daerah leher-kepala diperkirakan dapat juga menyebabkan kematian sel dalam jaringan pulpa termasuk sel odontoblas. Sel odontoblas adalah sel spesifik dalam kompleks jaringan pulpa pada lapisan terluar pulpa yang berfungsi untuk membentuk dentin termasuk dentin reparatif dan sklerotik. Dentin ini merupakan salah satu mekanisme pertahanan gigi dalam menghambat berbagai injuri terhadap pulpa.^{3,4}

Efek biologis radiasi terhadap sel dapat secara melalui efek langsung maupun tidak langsung. Efek tidak langsung adalah melalui pembentukan radikal bebas yang dihasilkan oleh ionisasi molekul air.⁵ Efek biologis radiasi terhadap sel adalah kematian sel (nekrosis atau apoptosis) sebagai efek jangka pendek dan transformasi keganasan sebagai efek jangka panjang.⁶

Kematian sel akibat radiasi dapat berupa nekrosis atau apoptosis; tergantung pada dosis dan lama radiasi diberikan serta tergantung dari kecepatan proses kematian sel. Nekrosis terjadi apabila stabilitas membran sel terganggu sehingga terjadi kegagalan pompa natrium yang berakhir dengan kematian sel. Apoptosis dan transformasi keganasan terjadi karena adanya lesi pada DNA yang gagal diperbaiki. Sel akan menjadi apoptosis atau transformasi keganasan

tergantung bagian genetik mana yang mengalami kerusakan.^{6,7}

Apoptosis adalah bentuk kematian sel yang terprogram (*programmed cell death*) yang dapat terjadi secara fisiologis maupun patologis. Apoptosis dapat direspons secara fisiologis, adaptif dan patologis. Apoptosis disebabkan oleh suatu stimulus dengan dosis yang relatif kecil dibandingkan stimulus yang menyebabkan nekrosis.⁶ Apoptosis merupakan proses yang normal pada embriogenesis dan homeostasis untuk kelangsungan hidup organisme. Melalui proses apoptosis, sel yang rusak akan dieliminasi, sedangkan sel yang masih berfungsi baik akan dibiarkan tetap berproliferasi sehingga dapat melindungi organisme atau tubuh dari kerusakan. Apoptosis dikendalikan oleh berbagai protein dalam sel terutama adalah kelompok protein *Bcl-2*. Kelompok protein *Bcl-2* terdiri dari protein pro-apoptosis seperti *Bax*, *Bad* dan *Bid*; dan protein anti-apoptosis seperti *Bcl-2* dan *Bcl-x*. Kontrol yang hilang pada proses apoptosis mempunyai peran penting pada proses transformasi keganasan.^{6,9}

Penelitian sebelumnya mengenai efek radiasi ionisasi terhadap sel-sel jaringan pulpa menunjukkan bahwa radiasi dapat menyebabkan fibrosis, atropi dan nekrosis pada jaringan pulpa; sedangkan sel odontoblasnya mengalami perubahan pada morfologi dan pembentukan osteodentin.¹⁰ Penelitian mendapatkan bahwa radiasi ionisasi dengan dosis 100 rad, 200 rad dan 400 rad dapat menyebabkan perubahan morfologi inti sel odontoblas yaitu piknosis, karioreksis dan kariolisis.¹¹ Penelitian sebelumnya mendapatkan bahwa terjadi peningkatan apoptosis sel fibroblas jaringan pulpa akibat paparan radiasi ionisasi.¹² Penelitian ini dimaksudkan untuk mengetahui lebih lanjut efek radiasi ionisasi dengan dosis tunggal 100, 200 dan 400 rad terhadap apoptosis sel odontoblas.

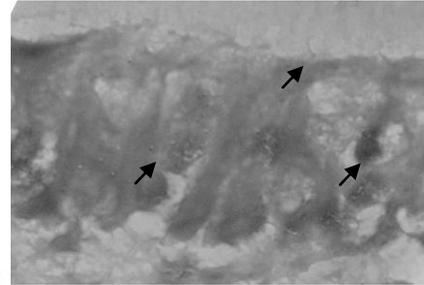
Bahan dan Cara Kerja

Jenis penelitian adalah eksperimental laboratorium dengan menggunakan rancangan

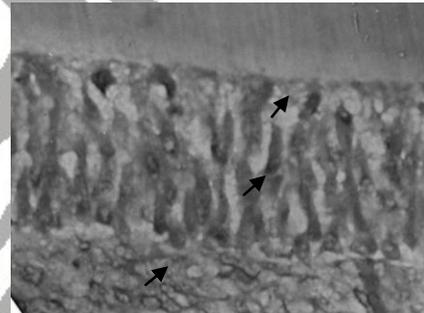
The Posttest-Only Control Group Design. Sampel penelitian adalah tikus putih (*Rattus norvegicus*) strain wistar jantan dengan usia 3 – 4 bulan, sehat dan berat badan 125 – 150 gram. Pengambilan dan pengelompokan sampel dilakukan secara acak. Sampel dibagi menjadi 4 kelompok, yaitu Kelompok 1 (kontrol), Kelompok 2 (paparan radiasi dosis tunggal 100 rad), Kelompok 3 (paparan radiasi dosis tunggal 200 rad) dan Kelompok 4 (paparan radiasi dosis tunggal 400 rad). Besar sampel untuk masing-masing kelompok adalah 6 ekor.

Sebelum pemaparan radiasi, binatang coba difiksasi dalam pipa PVC dengan diameter dan panjang yang sesuai, sehingga moncong kepala tikus dapat keluar di bagian depan pipa. Bagian depan kepala diarahkan pada alat pemapar radiasi. Sumber radiasi yang digunakan adalah *Cobalt-60 Teletherapy Unit* tipe XK-100 merk Philip. Binatang coba di matikan setelah 24 jam dari pemaparan radiasi. Gigi insisivus bawah beserta tulang rahangnya diambil untuk dibuat sediaan histopatologis. Pemeriksaan sel yang mengalami apoptosis dilakukan dengan metode *TUNEL Assay* menggunakan *S7101 Apoptag Plus Peroxidase In Situ Apoptosis Detection Kit*. Pengamatan dan penghitungan dilakukan dengan mikroskop cahaya pembesaran 400 kali. Daerah yang diamati yaitu pada sepertiga pulpa bagian tengah gigi (*1/3 middle*) pada dua tempat, yaitu bagian labial dan palatal yang kemudian diambil rata-rata. Identifikasi dan penghitungan sel dilakukan dengan bantuan *grateculae*. Penghitungan sel dinyatakan dalam persen, yaitu jumlah seluruh sel yang mengalami apoptosis kemudian dibandingkan dengan jumlah seluruh sel odontoblas baik yang apoptosis maupun yang tidak dalam satu lapang pandang dikalikan 100%. Data yang diperoleh dilakukan analisis statistik menggunakan *One-way anova* dan analisis *Least Significant Different* (LSD). Semua pengujian menggunakan $\alpha = 0,05$.

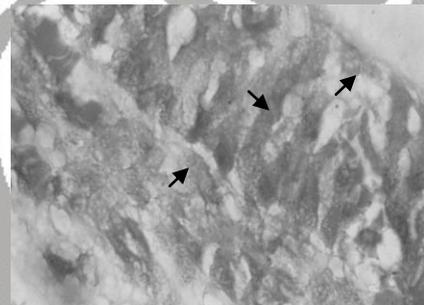
Fotograf Hasil Peneliti



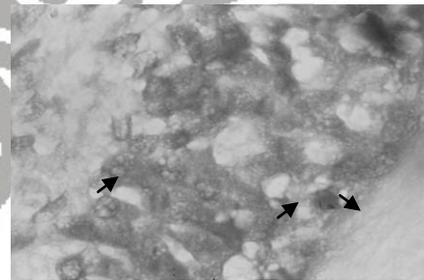
Kelompok 1 (kontrol ; radiasi 0 derajat)



Kelompok 2 (radiasi 100 derajat)



Kelompok 3 (radiasi 200 derajat)



Kelompok 4 (radiasi 400 derajat)

Gambar 1. Fotograf hasil pewarnaan dengan *S7101 Apoptag Plus Peroxidase In Situ Apoptosis Detection Kit* (Keterangan: panah putih: sel odontoblas yang tidak mengalami apoptosis; panah hitam: sel odontoblas yang mengalami apoptosis; panah merah : dentin)

Hasil

Berdasarkan Tabel 1 terlihat bahwa apoptosis sel odontoblas paling banyak terjadi (24%) pada Kelompok 3 yaitu pada paparan radiasi ionisasi dosis tunggal 200 rad, sedangkan paling kecil terjadi pada Kelompok kontrol atau Kelompok yang tidak dilakukan paparan radiasi ionisasi. Uji *One-way anova* ada perbedaan yang bermakna dari semua kelompok ($p < 0,05$). Hasil uji LSD juga menunjukkan ada perbedaan yang bermakna antar masing-masing kelompok ($p < 0,05$).

Tabel 1: Rerata persentasi sel odontoblas yang mengalami apoptosis akibat radiasi ionisasi dosis tunggal yang diamati setelah 24 jam dari radiasi.

Dosis	N	Mean (%)	SD	Multicomparison
Klp 1 (0 rad)	6	5,1500	1,0263	Klp 2 (100 rad)* Klp 3(200 rad)* Klp 4 (400 rad)*
Klp2 (100 rad)	6	12,7200	1,0960	Klp 1 (0 rad)* Klp 3(200 rad)* Klp 4 (400 rad)*
Klp 3 (200 rad)	6	24,3250	2,4982	Klp 1 (0 rad)* Klp 2 (100 rad)* Klp 4 (400 rad)*
Klp 4 (400 rad)	6	15,2233	1,3570	Klp 1 (0 rad)* Klp 2 (100 rad)* Klp 3(200 rad)*

Pembahasan

Penggunaan radiasi untuk kepentingan hidup manusia telah memberikan manfaat yang sangat besar. Namun demikian penggunaan radiasi terutama radiasi ionisasi juga memberikan dampak yang merugikan. Radiasi ionisasi adalah agen yang kuat dalam menimbulkan kerusakan bahkan kematian terhadap sel, jaringan atau organ dalam tubuh.

Penelitian yang telah dilakukan mendapatkan bahwa terjadi peningkatan persentase apoptosis sel odontoblas akibat paparan radiasi ionisasi, baik pada dosis 100 rad, 200 rad dan 400 rad. Hal ini membuktikan kebenaran dari teori bahwa radiasi ionisasi

adalah agen yang kuat dalam menimbulkan kerusakan bahkan kematian sel.⁶

Apoptosis sel odontoblas terjadi karena paparan radiasi ionisasi menyebabkan kerusakan pada DNA. DNA adalah target utama paparan radiasi karena DNA merupakan struktur sub-sel yang mempunyai radiosensitivitas paling tinggi sehingga kerusakan yang dialami juga paling banyak.⁵ Kerusakan DNA ini apabila gagal diperbaiki, akan berakhir pada kematian sel yaitu apoptosis atau nekrosis.

Secara umum pada setiap sel termasuk sel odontoblas, air merupakan komponen (molekul) yang jumlahnya paling besar sekitar 80% berat,⁵ sehingga diperkirakan kerusakan atau kematian sel yang terjadi sebagian besar terjadi melalui efek tidak langsung, yaitu disebabkan oleh radikal bebas. Radikal bebas adalah produk yang dihasilkan dari proses radiolisis molekul air. Diperkirakan hanya sebagian kecil saja kematian sel odontoblas pada penelitian ini terjadi melalui efek langsung.

Apoptosis pada sel yang mendapatkan paparan radiasi ionisasi adalah apoptosis yang terjadi melalui jalur internal atau jalur mitokondria. Dalam hal ini mitokondria melalui beberapa protein yang diekspresikan mempunyai peran sangat penting dalam regulasi proses apoptosis. Apoptosis melalui jalur mitokondria terutama diregulasi oleh protein kelompok *Bcl-2* yang terdapat pada permukaan luar mitokondria. Kelompok protein *Bcl-2* terdiri dari kelompok protein yang pro-apoptosis dan anti-apoptosis. Termasuk kelompok protein pro-apoptosis adalah *Bax*, *Bad* dan *Bid*; sedangkan kelompok protein yang anti apoptosis adalah *Bcl-2* sendiri dan *Bcl-xl*.^{8,13}

Pada sel yang normal, pada permukaan luar mitokondria terdapat ekspresi protein *Bcl-2* yang berikatan dengan protein *apoptotic protease activating factor-1 (Apaf-1)* dan *procaspase-3*. Adanya kerusakan DNA, maka pada sel tersebut akan terjadi aktivasi *p53* yang selanjutnya akan mengaktifasi anggota protein kelompok *Bcl-2* yang pro-apoptosis terutama *Bax*. *Bax* yang teraktivasi akan berinteraksi dengan protein *Bcl-2* yang anti-apoptosis.

Interaksi tersebut akan menyebabkan *Bcl-2* melepaskan ikatan dengan *apaf-1* dan hal ini akan menyebabkan fungsi normal anti apoptosis terganggu. Interaksi *Bax-Bcl-2* juga akan menyebabkan aktivasi *pro-caspase-3* menjadi *caspase-3*. Interaksi protein pro-apoptosis dan anti apoptosis juga akan menyebabkan *mitochondrial permeability transition pore* (MPTP) terbuka sehingga menyebabkan *cytochrom-c* terlepas. *Cytochrom-c* pada keadaan normal berada di antara membran luar dan membran dalam mitokondria dan berperan sebagai mediator pada fase eksekusi apoptosis. *Cytochrom-c* yang terlepas akan berikatan dan mengaktifkan *apaf-1* dan selanjutnya akan berikatan dan mengaktifkan *pro-caspase-9* menjadi *caspase-9*. Ketiganya kemudian akan membentuk kompleks *cytochrom-c*, *apaf-1*, *caspase-9* dan ATP yang disebut *apoptosom*. Agregasi ini terdapat dalam sitosol. *Caspase* (*cysteine aspartyl specific protease*) adalah suatu *protease* yang berasal dari residu asam aspartat yang berperan sebagai efektor atau eksekutor serta regulator utama dalam pelaksanaan proses kematian sel. Satu *caspase* yang aktif, maka akan mengaktifkan *caspase* yang lain terutama *caspase-3* (*effector/executor protease*) yang akan menyebabkan aktivitas proteolitik seperti digesti struktur protein pada sitoplasma, digesti DNA menjadi fragmen dengan ujung 3'OH dan berbagai perubahan morfologis apoptosis. Akhirnya sel yang apoptosis ini akan difagosit oleh sel sehat yang berdekatan.^{8,14}

Apoptosis yang terjadi pada sel odontoblas ini, kemungkinan juga di inisiasi oleh produk biokimia yang berasal dari stres intraseluler. Radikal bebas yang terbentuk akibat radiolisis molekul air merupakan salah satu faktor yang menyebabkan stres intraseluler yang kemudian memberikan sinyal kepada mitokondria sehingga terjadi perubahan pada mitokondria. Perubahan pada mitokondria dimulai pada membran luar yang terbuka, kemudian diikuti oleh pembengkakan matriks dan potensial transmembran hilang, sehingga mitokondria kehilangan fungsi transpor elektron. Keadaan ini akan mengakibatkan protein dalam mitokondria seperti *Cytochrom-c* akan terlepas.

Cytochrom-c yang terlepas akan mengaktifkan *caspase 9* yang kemudian akan menggerakkan proses apoptosis.^{6,15}

Dibandingkan dengan penelitian sebelumnya yang dilakukan oleh peneliti sendiri dengan perlakuan yang sama tetapi terhadap sel fibroblas pulpa menunjukkan bahwa pada dosis paparan yang sama, peningkatan persentase apoptosis sel odontoblas lebih rendah dibandingkan sel fibroblas pulpa. Hal ini disebabkan karena radiosensitivitas sel odontoblas lebih rendah dibandingkan sel fibroblas jaringan pulpa. Radiosensitivitas suatu sel berdasarkan hukum "Bergonie dan Tribondeau", disebutkan bahwa sensitivitas suatu jaringan atau sel terhadap radiasi ionisasi berbanding terbalik dengan derajat diferensiasinya.¹⁶ Dengan kata lain sel yang berproliferasi lebih cepat mempunyai radiosensitivitas yang lebih tinggi pula. Di dalam jaringan pulpa sel fibroblas merupakan *precursor cell* (sel induk) sehingga sel ini memang mempunyai tingkat proliferasi yang tinggi.^{17,18}

Hasil penelitian ini juga mirip dengan penelitian sebelumnya terhadap sel fibroblas jaringan pulpa, bahwa persentase sel odontoblas yang mengalami apoptosis meningkat seiring dengan peningkatan dosis radiasi ionisasi, tetapi pada dosis tertentu akan mencapai jumlah yang tertinggi dan pada dosis yang lebih tinggi lagi akan terjadi penurunan kembali. Fenomena ini dapat menerangkan bahwa apoptosis hanya terjadi pada dosis radiasi yang rendah. Hal ini sesuai dengan teori yang sudah ada bahwa apoptosis umumnya terjadi pada dosis radiasi yang rendah sampai sedang, sedangkan pada dosis radiasi yang lebih tinggi kematian sel dalam bentuk apoptosis akan menurun dan terjadi peningkatan bentuk kematian sel yang lain, yaitu nekrosis.

Pada paparan radiasi ionisasi dengan dosis yang lebih besar, maka energi foton dari radiasi ionisasi (efek langsung) dan radikal bebas yang terbentuk (efek tidak langsung) tidak saja akan merusak molekul DNA (yang mengarah ke apoptosis), tetapi juga akan merusak molekul atau senyawa dalam sel yang lain terutama molekul/senyawa penyusun membran sel

seperti lipid dan protein, sehingga membran sel akan mengalami kerusakan dan permeabilitas sel akan terganggu. Keadaan ini akan menyebabkan air dan cairan yang lain dengan mudah dapat masuk ke dalam sel, sel akan mengalami pembengkakan (*swelling*) yang hebat dan berakhir dengan kematian sel (nekrosis).

Selain karena peningkatan kematian dalam bentuk nekrosis, faktor lain penyebab penurunan persentase apoptosis pada kelompok sampel yang mendapat paparan radiasi ionisasi 400 rad adalah karena adanya proses pembersihan atau fagositosis. Proses apoptosis berlangsung cukup cepat, yaitu hanya berlangsung dalam beberapa jam dan sel selanjutnya akan segera difagosit oleh sel sehat yang berdekatan. Penyebab yang lain adalah karena adanya hambatan dalam proses regenerasi sel yang dapat terjadi akibat radiasi ionisasi dengan dosis yang besar.

Jumlah sel apoptosis yang ditemukan pada penelitian ini hanyalah jumlah sel apoptosis yang terjadi pada saat 24 jam setelah paparan radiasi saja. Jumlah yang sebenarnya dari sel yang mengalami apoptosis tetap sulit diketahui dengan pasti, baik sebelum 24 jam maupun yang setelah 24 jam dari paparan radiasi

Pada kelompok kontrol ternyata juga ditemukan adanya sel odontoblas yang mengalami apoptosis. Hal ini membuktikan bahwa apoptosis juga dapat terjadi secara fisiologis, yang salah satunya adalah sebagai mekanisme homeostasis dalam rangka memelihara populasi sel dalam jaringan. Hasil penelitian pada kelompok kontrol ini kemungkinan sebagian juga dapat terjadi akibat perlakuan pada binatang coba selama pelaksanaan penelitian.

Daftar Acuan

- Hassan K, Khier S. Effect of Therapeutic Gamma Radiation on Diametral Tensile Strength and Microhardness of Photo-Cured Glass Ionomer Cement. *The Saudi Dental Jurnal* 1997; 9(3):120-4
- Hendratta JH. Efek Radioterapi Kanker Kepala dan Leher Terhadap Jaringan Dalam Mulut. *Meditek* 2003; 11 : 29 : 29 – 35.
- Kidd EAM, Bechal SJ. 1992. *Dasar-Dasar Karies: Penyakit dan Pencegahannya*. Terjemahan dari: *Essentials of Dental Caries: The Disease and Its Management*. Alih Bahasa: Narlan S dan Faruk S, Jakarta: EGC, hlm 33-37
- <http://en.wikipedia.org/wiki/odontoblast;13/7/2007>.
- Bushong SC. Radiation protection. New York : c Graw-Hill; 1998 p. 29-37, 75-80.
- Cotran RS, Kumar V, Collins T. *Robbins pathologic basis of disease*, 6th ed., Philadelphia: WB Saunder Company; 1999. p. 1 - 28.
- Robens. *Apoptosis*. [URI]. <http://www.Geocities.com/collegePark/lab/bcl-2.htm>. 2001.
- Wang X. The expanding role of mitochondria in apoptosis. *Gen Dev* 2001; 15 : 2922 – 33.
- <http://id.wikipedia.org/wiki/Apoptosis:11/2/2006>
- Morse DR. Age-Related Change of The Dental Pulp Complex and Their Relationship to Systemic aging. *Oral Surgery, Oral Med, Oral Pathol* 1991; 72 : 721-45
- Pratama CS. 1994. Pengaruh radiasi Pengion Dosis Tungga pada Sel Odontoblas Gigi Insisif Tikus Putih . *Tesis*, Surabaya : Pascasarjana
- Supriyadi. 2005. Efek radiasi ionisasi dosis tunggal 200 rad terhadap apoptosis sel fibroblas jaringan pulpa. *Majalah Kedokteran Gigi (dental journal)* edisi khusus TIMNAS IV 11-13 Agustus 2005: 481-5
- Tauhid NA, Indra Wijaya, Ahmad Zulfa. *Dasar biologi molekuler*. Semarang : Badan Penerbit Universitas Diponegoro; 2000
- Reed JC. Mechanism of apoptosis. *American Journal of Pathology*. 2000; 157(5) : 1415 – 30.
- Green DR, Reed JC. Mitochondria and apoptosis. *Science* 1998; 281: 72-5.
- Lawler W, Ali Ahmed, Hume W.J, 1992. *Buku Pintar Patologi untuk Kedokteran Gigi*. Jakarta: EGC, hlm 5-6, 57-61.
- Bhaskar SN. *Orban's oral histology and embriology*. 11th ed., St Louis-Baltimor- Boston etc: Mosby Year Book; 1990. p. 139-56.
- Leeson CR, Leeson TR, Paparo TA. *Buku Ajar Histologi*, Edisi 5, Jakarta; EGC 1990 : 6-12, 116-117,336-337.