

APOPTOSIS SEL FIBROBLAS JARINGAN PULPA AKIBAT PAPANAN RADIASI IONISASI

Supriyadi

Bagian Radiologi Kedokteran Gigi Fakultas Kedokteran Gigi Universitas Jember

Abstract

In vivo apoptosis of fibroblast pulp cells by ionizing radiation from radiotherapy of the head and neck area has not yet been demonstrated. The study aimed to show *in vivo* the effect of a single dose of ionizing radiation on apoptosis of fibroblast pulp cells. The sample group consisted of 24 healthy male Wistar rats that were 3–4 months old and 150–200 g in weight. The rats were divided into 4 groups of 6 rats that were subjected to Cobalt 60 radiation to the head at the levels of 0, 100, 200 or 400 rad. The rats were sacrificed 24 hours after radiation exposure, and the lower incivus were taken for histopatological processing. Apoptosis was detected by using the TUNEL Assay method. The apoptotic fibroblast pulp cells were counted under light microscope by multiple observers using the blind test approach. The fraction of apoptotic cells was counted as mean of labial and palatal sides of the teeth below odontogenic and free-cell zone. The data were statistically analyzed using one-way anova. The results showed the percentage of apoptotic of fibroblast pulp cells was 6.4, 23.7, 34.5 and 17.8% after 0, 100, 200 and 400 rad doses, respectively. There were significant differences in the apoptotic percentages between the four groups ($p < 0.05$). In conclusion, the highest fraction of apoptotic fibroblast pulp cells was found after a single 200 rad dose, and this fraction decreased after a single dose of 400 rad.

Key words: ionizing radiation; apoptotic; fibroblast pulp cell

Pendahuluan

Penggunaan radiasi ionisasi di kedokteran cukup tinggi. Radiasi ini terutama digunakan untuk tujuan diagnosis dan terapi. Suatu penelitian yang dilakukan di Rumah Sakit Umum Daerah (RSUD) Dr Soetomo Surabaya mendapatkan bahwa penderita yang mendapatkan terapi radiasi kanker di daerah kepala dan leher selama 1 tahun mencapai hampir 3000 penderita.¹

Penggunaan radiasi ionisasi pada radioterapi mempunyai efek biologis pada sel atau jaringan hidup, sehingga radioterapi dapat memberikan efek samping yang tidak diharapkan pada sel atau

jaringan di sekitar daerah sasaran radiasi. Efek biologis radiasi adalah kematian sel (nekrosis dan apoptosis) dalam jangka pendek dan transformasi keganasan dalam jangka panjang.²

Apoptosis adalah mekanisme biologis yang merupakan jenis kematian sel yang terprogram, yang dapat terjadi pada kondisi fisiologis maupun patologis. Apoptosis digunakan oleh organisme multi sel untuk membuang sel yang sudah tidak diperlukan oleh tubuh. Apoptosis pada umumnya berlangsung seumur hidup dan bersifat menguntungkan bagi tubuh.^{2,3} Apoptosis dapat terjadi selama perkembangan, sebagai mekanisme homeostasis untuk menjaga atau memelihara populasi sel dalam jaringan,

sebagai mekanisme pertahanan jika sel rusak oleh suatu penyakit atau bahan racun dan pada proses penuaan.³ Kontrol yang hilang pada proses apoptosis mempunyai peran penting pada proses transformasi keganasan. Apoptosis dikendalikan oleh berbagai protein 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-xl*.^{4,5}

Efek biologis radiasi ionisasi terjadi melalui efek langsung dan efek tidak langsung. Efek langsung radiasi terjadi karena energi foton radiasi langsung mengenai molekul penting dalam sel; sedangkan efek tidak langsung radiasi terjadi melalui pembentukan radikal bebas hasil ionisasi molekul air dalam sel, seperti radikal bebas hidrogen (H^*) dan terutama yang paling berbahaya adalah radikal bebas hidroksil (OH^*). Radikal bebas adalah molekul yang tidak stabil dan berumur pendek. Radikal bebas hanya bertahan (*exist*) dalam sel kurang dari 1 mikrodetik tetapi mempunyai energi yang berlebihan, dapat menyebar ke seluruh bagian sel dan merusak ikatan molekul yang penting dalam sel.⁶

Deoxyribonucleic acid (DNA) adalah molekul yang menjadi sasaran utama baik pada efek langsung maupun efek tidak langsung dari radiasi. Hal ini disebabkan DNA adalah molekul yang paling peka terhadap radiasi. Radiasi sebesar 100 rad sudah cukup menyebabkan kerusakan inti sel karena DNA berada dalam inti sel, sedangkan sitoplasma membutuhkan dosis radiasi mendekati 1000 rad untuk dapat menyebabkan kerusakan. Target molekul lain adalah seperti RNA, lipid dan protein.⁶

Efek samping radioterapi kanker di daerah kepala-leher yang sudah umum terjadi adalah peningkatan insidensi karies gigi sebagai akibat lanjut dari xerostomia. Efek yang lain adalah peningkatan kecepatan perkembangan karies gigi dan kerusakan gigi yang lain. Hal ini disebabkan radiasi diperkirakan juga menyebabkan kematian sel dalam jaringan pulpa termasuk sel fibroblas. Fibroblas jaringan pulpa berjumlah paling banyak dan mempunyai peran penting untuk menjaga integritas dan vitalitas jaringan pulpa. Fibroblas mempunyai fungsi utama membentuk dan mempertahankan matriks jaringan pulpa, yaitu membentuk *ground substance* dan serat kolagen. Fibroblas adalah *ameloblast and odontoblast precursor cell* yang dapat berubah menjadi ameloblas atau odontoblas tergantung pada stimulus.⁷ Penelitian sebelumnya menunjukkan bahwa radiasi sebesar 200 rad dapat menyebabkan

peningkatan apoptosis sel fibroblas pulpa.⁸ Penelitian ini dimaksudkan untuk mengetahui lebih lanjut efek radiasi ionisasi dengan dosis tunggal 100, 200 dan 400 rad terhadap apoptosis sel fibroblas jaringan pulpa.

Bahan dan Cara Kerja

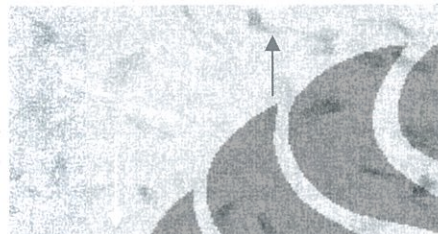
Penelitian eksperimental laboratorium ini menggunakan rancangan *The Postest-Only Control Group Design*. Populasi penelitian adalah tikus putih (*Rattus norvegicus*) strain wistar jantan. Pengambilan dan pengelompokan sampel dilakukan secara acak menjadi 4 kelompok, yaitu kelompok 1 (kontrol), kelompok 2 (paparan radiasi dosis tunggal 100 rad), kelompok 3 (paparan radiasi dosis tunggal 200 rad) dan kelompok 4 (paparan radiasi dosis tunggal 400 rad). Kriteria sampel adalah binatang coba berumur 3-4 bulan, berat badan 125-150 gram dan sehat. Besar sampel adalah 6 ekor untuk masing-masing kelompok.

Sebelum pemaparan radiasi, binatang coba difiksasi dalam pipa PVC dengan diameter dan panjang yang sesuai, sehingga moncong kepala tikus dapat ke luar di bagian depan pipa. Bagian depan kepala terutama daerah gigi insisif bawah diarahkan pada alat pemapar radiasi. Sumber radiasi yang digunakan adalah *Cobalt-60 Teletherapy Unit* tipe XK-100 merk Philip. Binatang coba dimatikan setelah 24 jam dari pemaparan radiasi, kemudian gigi insisif bawah diambil beserta tulang rahangnya, lalu dibuat sediaan histopatologis. Pewarnaan sediaan untuk 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 (*1/3 middle*) di bawah lapisan sel odontoblas pada dua tempat, yaitu bagian labial dan palatal kemudian diambil rata-ratanya. Identifikasi dan penghitungan sel dilakukan dengan bantuan *grateculae* oleh 3 orang pengamat secara *blind-test*. Penghitungan sel dinyatakan dalam persen, yaitu jumlah seluruh sel yang mengalami apoptosis dibandingkan dengan jumlah seluruh sel fibroblas baik yang apoptosis maupun yang tidak dalam satu lapang pandang dikalikan 100%. Analisis data menggunakan *One-way anova* (α 0,05).

Hasil

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

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



Gambar 1. Kelompok 3 (kontrol: radiasi 0 rad)



Gambar 2. Kelompok 4 (radiasi 200 rad)

Keterangan :
Panah putih = sel yang tidak mengalami apoptosis
Panah hitam = sel yang mengalami apoptosis

Pembahasan

Penemuan sinar radiasi terutama radiasi ionisasi seperti sinar X dan sinar gamma telah memberikan sumbangan yang sangat besar terhadap perkembangan dan kemajuan di dunia kedokteran terutama dalam sub-bidang radiodiagnostik dan radioterapi. Selain memberikan manfaat yang besar bagi manusia, penggunaan radiasi ionisasi juga memberikan dampak yang merugikan pada manusia. Radiasi terutama radiasi ionisasi adalah salah satu agen yang kuat dalam menimbulkan kerusakan bahkan kematian pada sel, jaringan atau organ.

Dosis radiasi yang digunakan dalam penelitian ini adalah 0 rad sebagai kontrol, 100 rad, 200 rad dan 400 rad. Digunakan dosis 200 rad karena dosis ini merupakan dosis fraksinasi yang biasa digunakan dalam radioterapi. Selain itu pada penelitian

sebelumnya, radiasi dosis ini telah terbukti meningkatkan persentase apoptosis sel fibroblas jaringan pulpa.⁸ Dosis fraksinasi 200 rad kemudian diturunkan setengahnya yaitu 100 rad dan dinaikkan 2 kali yaitu 400 rad untuk digunakan dalam penelitian ini.

Pada penelitian ini apoptosis sel fibroblas jaringan pulpa dideteksi dengan metode *Terminal Deoxyuridine Nucleotide End Labelling Assay (TUNEL Assay)* menggunakan *S7101 apoptag Plus Peroxidase In Situ Apoptosis Detection Kit*. Dasar teknologi *apoptag* ini adalah mendeteksi rantai DNA yang putus baik rantai tunggal maupun rantai ganda yang berhubungan dengan apoptosis secara enzimatis, yaitu dengan cara memberikan label pada ujung bebas 3'-OH yang banyak ditemukan pada sel yang mengalami apoptosis. Teknik ini sangat sensitif karena dapat mendeteksi tahap awal proses apoptosis yaitu pada saat kondensasi kromatin dan kerusakan rantai DNA masih sedikit serta belum terjadi perubahan morfologis pada inti sel. Teknik ini juga dapat membedakan antara sel yang menjadi nekrosis dengan sel apoptosis karena teknik ini hanya mendeteksi kerusakan DNA yang berhubungan dengan apoptosis saja, yaitu adanya fragmen DNA dengan ujung 3'-OH.⁹

Penelitian yang telah dilakukan mendapatkan bahwa terjadi peningkatan persentase apoptosis sel fibroblas jaringan pulpa akibat paparan radiasi ionisasi, baik pada dosis 100 rad, 200 rad maupun 400 rad. Hal ini membuktikan kebenaran dari teori bahwa radiasi ionisasi adalah agen yang kuat dalam menimbulkan kerusakan bahkan kematian sel.²

Apoptosis sel fibroblas jaringan pulpa terjadi akibat paparan radiasi ionisasi yang menyebabkan kematian pada DNA. DNA adalah target utama paparan radiasi karena DNA merupakan struktur sub-sel yang radiosensitifitasnya paling tinggi sehingga kerusakan yang dialami juga paling banyak. Dalam sel, air merupakan molekul yang jumlahnya paling besar (80% berat).⁶ Diperkirakan kerusakan DNA tersebut sebagian besar terjadi melalui efek tidak langsung, yaitu oleh radikal bebas hasil radiolisis molekul air. Sebagian yang lain melalui efek langsung.

Apoptosis pada sel yang mendapatkan paparan radiasi ionisasi adalah apoptosis yang terjadi melalui jalur internal atau melalui jalur mitokondria. Dalam hal ini mitokondria melalui beberapa protein yang diekspresikan mempunyai peran sangat penting dalam regulasi proses apoptosis. Apoptosis melalui jalur mitokondria terutama diregulasi oleh protein kelompok *Bcl-2* yang terdapat pada permukaan luar mitokondria. Kelompok protein *Bcl-2* terdiri dari

kelompok protein yang pro-apoptosis dan anti-apoptosis. Termasuk kelompok protein pro-apoptosis adalah *Bax*, *Bad* dan *Bid*; sedangkan kelompok protein yang anti apoptosis adalah *Bcl-2* sendiri dan *Bcl-xl*.¹⁰

Dalam sel yang normal, pada permukaan luar mitokondria terdapat ekspresi protein *Bcl-2* yang berikatan dengan protein *apoptotic protease activating factor-1* (*Apaf-1*) dan *pro-caspase-3*. Seperti yang telah disebutkan di atas, dengan terjadinya kerusakan DNA, maka akan terjadi aktivasi *p53* yang selanjutnya akan mengaktifkan 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* (*efector/executor protease*) yang akan menyebabkan aktifitas proteolitik seperti digesti struktur protein pada sitoplasma, digesti DNA menjadi fragmen dengan ujung 3' OH dan berbagai perubahan morfologis apoptosis. Akhirnya sel yang apoptosis ini akan difagosit oleh sel sehat yang berdekatan.^{10,11}

Respons seluler terhadap aktivasi *p53* akibat kerusakan DNA setelah paparan radiasi ionisasi; apakah akan terjadi penghentian siklus sel dan kemudian terjadi perbaikan DNA sehingga sel menjadi normal lagi atukah akan terjadi apoptosis, belum dapat diketahui dengan pasti. Beberapa peneliti menyebutkan bahwa hal ini berkaitan dengan tingkat radioresistensi atau radiosensitifitas setiap sel. Respons seluler akibat paparan radiasi ionisasi

mempunyai perbedaan pada setiap sel. Telah disepakati bahwa semua jenis sel yang mengalami kerusakan DNA selalu menghasilkan peningkatan *p53*.¹²

Apoptosis yang terjadi pada penelitian ini kemungkinan juga diionisasi oleh produk biokimia yang berasal dari stres intraseluler. Radikal bebas yang terbentuk akibat radiasi ionisasi merupakan salah satu faktor yang menyebabkan stres intraseluler. Stres ini dapat memberikan sinyal kepada mitokondria sehingga terjadi perubahan pada mitokondria. Perubahan pada mitokondria dimulai pada membran luar yang terbuka, kemudian diikuti oleh pembengkakan matriks dan potensial transmembran hilang, sehingga mitokondria kehilangan fungsi transport elektronnya. 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.^{2,13}

Hasil penelitian ini juga menunjukkan bahwa persentase sel fibroblas jaringan pulpa yang mengalami apoptosis meningkat seiring dengan peningkatan dosis radiasi ionisasi. Tetapi pada dosis tertentu akan mencapai jumlah yang tertinggi dan pada dosis yang lebih tinggi lagi akan terjadi penurunan kembali. Fenomena ini dapat menerangkan bahwa apoptosis hanya terjadi pada dosis radiasi yang rendah atau sampai batas tertentu saja. Dalam penelitian ini sampai dosis 200 rad. Hal ini sesuai dengan keterangan yang sudah ada bahwa apoptosis terjadi pada dosis radiasi yang rendah sampai sedang², sedangkan pada dosis radiasi yang lebih tinggi kematian sel dalam bentuk apoptosis akan menurun dan diperkirakan terjadi peningkatan bentuk kematian sel yang lain, yaitu berupa nekrosis.

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

peningkatan bentuk kematian sel yang lain, yaitu nekrosis.

Faktor lain yang menyebabkan penurunan persentase apoptosis pada kelompok sampel yang mendapat paparan radiasi ionisasi 400 rad adalah karena proses pembersihan atau fagositosis oleh jaringan terhadap sel yang mengalami apoptosis. Hal ini dimungkinkan karena proses apoptosis berlangsung cukup cepat, yaitu hanya berlangsung dalam beberapa jam dan selanjutnya akan segera difagosit oleh sel sehat yang berdekatan.² Faktor penyebab yang lain adalah karena terjadi hambatan kemampuan regenerasi atau proliferasi sel akibat radiasi ionisasi dengan dosis yang besar. Jumlah sel apoptosis yang ditemukan dalam 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 paparan radiasi.

Pada kelompok kontrol ternyata juga ditemukan adanya sel fibroblas jaringan pulpa yang mengalami apoptosis. Hal ini menunjukkan apoptosis juga dapat terjadi secara fisiologis. Salah satunya adalah sebagai mekanisme homeostasis dalam rangka memelihara populasi sel dalam jaringan.² Jumlah sel yang mengalami apoptosis pada jaringan yang normal juga bervariasi pada setiap sel, jaringan dan organ, karena masing-masing mempunyai kekhususan tersendiri sehingga responsnya terhadap radiasi ionisasi juga berbeda. Hasil penelitian pada kelompok kontrol ini kemungkinan sebagian juga dapat terjadi akibat perlakuan pada binatang coba selama pelaksanaan penelitian.

Kesimpulan

Terjadi peningkatan persentase apoptosis sel fibroblas jaringan pulpa akibat paparan radiasi

ionisasi sesuai dengan peningkatan dosis radiasi dari 0, 100 dan 200 rad, tetapi terjadi penurunan kembali pada dosis radiasi 400 rad. Penurunan apoptosis pada dosis 400 rad diduga disebabkan karena adanya peningkatan jenis kematian sel yang lain, yaitu nekrosis.

Daftar Acuan

1. Hendarti HT, Kartabrata MD, Sri Ayu. Dampak Terapi Radiasi Kanker Kepala dan Leher terhadap Timbulnya Kandidiasis Mulut. *Majalah Kedokteran Gigi (Dental Journal)*, 2001; 34 (3a) : 192-4.
2. Cotran RS, Kumar V, Collins T. *Robbins Pathologic Basis of Disease*, 6th ed. Philadelphia: WB Saunder Company. 1999: 1-28.
3. Andaim. *Apoptosis*. Diakses dari: <http://id.wikipedia.org/wiki/Apoptosis>: Accessed on November 21, 2006.
4. Robens. *Apoptosis*. [URI]. Diakses dari: <http://www.Geocities.com/collegePark/lab/bcl-2.htm>. 2001.
5. Tauhid NA, Indra Wijaya, Ahmad Zulfa. *Dasar Biologi Molekuler*. Semarang: Badan Penerbit Universitas Diponegoro; 2000.
6. Bushong SC. *Radiation Protection*. New York: Mc Graw-Hill; 1998: 29-37, 75-80.
7. Bhaskar SN. *Orban's Oral Histology and Embriology*. 11th ed. St Louis: Mosby Year Book. 1990:139-56.
8. Supriyadi. 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.
9. Intergen Technical Crew. *The Complete Apoptag Manual*. Intergen Company; 2001:1-16.
10. Wang X. The Expanding Role of Mitochondria in Apoptosis. *Gen Dev* 2001; 15 : 2922 - 33.
11. Reed JC. Mechanism of Apoptosis. *Am J Pathol*. 2000; 157(5): 1415-30.
12. Kastan M, Zhan Q, El-Deiry WS, Carrier F, Jacks T, Wals WV, et al. A Mammalian Cell Cycle Checkpoint Pathway Utilizing p53 and GADD45 is Defective in Ataxia - Telangiectasia. *Cell* 1992; 71 : 587 - 97.
13. Green DR, Reed JC. Mitochondria and Apoptosis. *Science*. 1998; 281: 72-5.