

RESEARCH ARTICLE

**PENGARUH PEMBERIAN RADIASI SINAR GAMMA TERHADAP EKSPRESI CASPASE-3 PADA SEL OTAK RATTUS NORVEGICUS VARIAN WISTAR JANTAN DENGAN METODE PENGEKATAN IMUNOHISTOKIMIA**

**EFFECT OF THE RADIATION OF GAMMA RAYS ON CASPASE-3 EXPRESSION IN RATTUS NORVEGICUS WISTAR MALE VARIANT BRAIN CELL WITH IMMUNOHISTOCHEMISTRY METHOD**

Ahmad Bayhaqi Nasir Alam\*, Masruroh Rahayu\*\*, Ahmad Zaki Sukma Islani\*\*\*

\*Laboratorium Radiologi Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya, Malang, Indonesia

\*\*Laboratorium Neurologi Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya, Malang, Indonesia

\*\*\*Program Studi Pendidikan Dokter Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya, Malang, Indonesia

pISSN : 2407-6724 • eISSN : 2442-5001 • <http://dx.doi.org/10.21776/ub.mnj.2015.001.02.5> • MNJ.2015;1(2):72-79

• Received 8 July 2014 • Reviewed 8 September 2014 • Accepted 8 November 2014

**ABSTRAK**

**Latar belakang.** Otak merupakan organ yang memiliki fungsi penting berpotensi terkena pengaruh buruk radiasi, terutama pada tumor kepala leher. Sinar gamma berinteraksi dengan molekul tubuh menyebabkan kerusakan DNA dan kemudian apoptosis. Caspase-3 berperan penting pada apoptosis sebagai caspase efektor.

**Tujuan.** Membuktikan bahwa pemberian radiasi sinar gamma kobalt-60 pada *Rattus norvegicus* varian wistar jantan menyebabkan apoptosis sel otak dengan jumlah sel apoptosis yang lebih banyak pada dosis tunggal daripada fraksinasi.

**Metode.** Penelitian eksperimental dengan rancangan perlakuan tunggal. Hewan coba dibagi secara acak menjadi 3 kelompok, yaitu: control, tunggal, dan fraksinasi.

**Hasil.** Peningkatan ekspresi caspase-3 pada sel otak yang diradiasi dengan dosis tunggal dan fraksinasi dibandingkan dengan sel otak kontrol adalah signifikan (ANOVA,  $p > 0,05$ ). Secara berurutan, indeks apoptosis tertinggi pada kelompok tunggal, fraksinasi, dan kontrol.

**Simpulan.** Pemberian radiasi sinar gamma Kobalt-60 menyebabkan apoptosis sel otak *Rattus norvegicus* varian wistar jantan dan dosis tunggal menyebabkan apoptosis sel otak lebih banyak daripada dosis fraksinasi.

**Kata kunci:** Apoptosis, caspase-3, otak, radiasi sinar gamma

**ABSTRACT**

**Background.** The brain is an organ that has an important function potentially exposed to bad influences of radiation, especially on the head neck tumors. Gamma rays interact with body molecules causing damage to DNA and subsequently apoptosis. Caspase-3 plays an important role in apoptosis as effector caspase.

**Objective.** To prove that the radiation of cobalt-60 gamma rays in *Rattus norvegicus* Wistar male variant causes brain cell apoptosis by the number of apoptotic cells more than in the single-dose fractionation.

**Methods.** This Experimental research using animals were randomly divided into 3 groups: control, single and fractionation.

**Results.** An increase in apoptotic index in the irradiated brain cells in single dose and fractionation dose compared by control group were significant (ANOVA,  $p > 0.05$ ). Sequentially, the highest apoptotic index in a single group, fractionation, and control.

**Conclusion.** The provision of radiation Cobalt - 60 gamma rays cause brain cell apoptosis *Rattus norvegicus* Wistar male variant and a single dose to cause apoptosis of brain cells more than the dose fractionation.

**Keywords:** apoptosis, caspase - 3, brain, gamma-ray radiation

---

**Korespondensi:** masrurohrahayu@yahoo.com

## PENDAHULUAN

Radiasi merupakan energi yang dipancarkan dalam bentuk partikel atau gelombang. Radiasi adalah suatu energi yang berasal dari sumber yang berjalan melalui materi atau ruang. Pemanfaatan radiasi dalam bidang kedokteran telah dilakukan secara luas dalam bidang diagnostik dan terapi, salah satunya adalah radiasi sinar gamma. Besaran dosis radiasi diberi satuan khusus dalam sistem satuan internasional (SI), yaitu Gray dan disingkat dengan Gy.<sup>1</sup>

Pengembangan fungsi dari radiasi dalam dunia kedokteran banyak dipergunakan untuk terapi keganasan, baik secara mandiri maupun digunakan bersamaan dengan pengobatan kanker lainnya, yakni pembedahan dan kemoterapi. Pengobatan kanker dengan radioterapi diperlukan upaya untuk memperoleh hasil secara maksimal, dengan komplikasi sekecil mungkin. Otak adalah salah satu organ tubuh manusia yang *radioresiste*. Namun, penggunaan radiasi dalam terapi keganasan didaerah kepala harus dilaksanakan dalam dosis yang terbatas karena dapat berpotensi terjadi kerusakan sel pada jaringan otak normal. Ada dua macam proses kematian sel, yaitu melalui nekrosis dan apoptosis. Berbeda dengan apoptosis, nekrosis merupakan suatu jenis kematian sel yang tidak terkendali. Pada saat pemeriksaan mikroskopis, bentukan dari sel sulit ditemukan karena hilangnya gambar khromatin, rusaknya membran dan penghancuran organel. Maka dari itu menentukan kematian sel melalui nekrosis lebih susah untuk diamati dari pada proses apoptosis.<sup>2,3</sup>

Radiasi menyebabkan kerusakan dari DNA untai ganda, sehingga mempengaruhi siklus sel. Kerusakan DNA menyebabkan pemberhentian siklus sel (*cell cycle arrest*) terutama pada sel yang aktif bermitosis. Kondisi ini berguna untuk memperbaiki kerusakan DNA, tetapi di sisi lain efek radiasi lebih cepat dibanding perbaikannya sendiri.<sup>4</sup>

Ali Ashgar Tehrani pada tahun 2010 mengungkapkan bahwa hasil penelitian dengan menggunakan tikus (berat 160-180 g) yang secara acak dibagi menjadi 4 kelompok (masing-masing terdiri atas 6 ekor tikus). Tiga kelompok diradiasi dengan 5 Gy, 7,5 Gy dan 12 Gy dan kelompok keempat sebagai kontrol normal. Hasil penelitian menunjukkan bahwa dosis radiasi berpengaruh terhadap perubahan jaringan otak tertentu. Studi

histopatologi dari sistem saraf pusat memperlihatkan bahwa lesi awal radiasi setelah paparan menyebabkan kongesti dan edema. Tanda dan perubahan yang irreversibel histologis termasuk gliosis, apoptosis neuron dan vakuola secara lebih jelas pada daerah subkortikal.<sup>5</sup>

Penelitian lain menyebutkan bahwa cedera sel glia pada tikus dewasa berkulit putih ditimbulkan dalam waktu 24 jam setelah radiasi tunggal dari seluruh otak (10 Gy atau 20 Gy). Hasil penelitian ini menunjukkan bahwa radiasi otak menginduksi apoptosis dengan melihat penurunan yang cepat dari populasi oligodendroglial, dan dapat berpartisipasi dalam pengembangan radiasi yang mengakibatkan kondisi patologi.<sup>6</sup>

Caspase-3 merupakan enzim yang berperan penting dalam menjalankan beberapa proses yang terkait dengan apoptosis. Morfologi sel otak yang mengalami apoptosis dapat dilihat dengan imunohistokimia caspase 3 lalu diamati dengan mikroskop cahaya dengan pembesaran 400x. Kriteria yang digunakan untuk menentukan morfologi sel yang mengalami apoptosis dengan memberikan ekspresi caspase 3 aktif akan memberikan warna coklat sedangkan yang tidak mengekspresikan akan berwarna biru pada intinya.<sup>7</sup>

Otak adalah bagian paling kompleks dari tubuh manusia. Organ dengan berat rata-rata tiga pon pada orang dewasa ini adalah tempat kecerdasan, penafsir indra, inisiator dari gerakan tubuh, dan pengendali perilaku. Mengingat pentingnya fungsi otak dalam sistem saraf pusat, efek negatif radiasi ionisasi yang saat ini digunakan sebagai modalitas terapi keganasan, dan belum adanya informasi atau penelitian tentang efek radiasi ionisasi terhadap apoptosis sel otak membuat penulis ingin meneliti efek radiasi sinar gamma terhadap apoptosis sel otak *Rattus norvegicus* varian Wistar jantan dengan parameter gambaran caspase-3. Radiasi sinar gamma akan diberikan dalam dua dosis, yaitu dosis tunggal dan dosis fraksinasi sebesar 10 Gy. Dosis 10 Gy dipilih karena dosis tersebut adalah dosis sedang (*moderate dose*) dimana fungsi normal sel dan jaringan masih dapat diamati setelah paparan dengan radiasi ionisasi. Pada akhirnya, penulis akan membandingkan apoptosis sel otak normal pada *Rattus norvegicus* varian Wistar jantan yang diberi radiasi sinar gamma dengan dosis tunggal dan dosis fraksinasi.

## METODE PENELITIAN

**Desain Penelitian.** Desain penelitian yang digunakan adalah metode penelitian eksperimental laboratorik (*post-test control*) dengan cara membandingkan hasil yang didapat sesudah perlakuan (*post-test*) dengan kontrol. Rancangan penelitian menggunakan rancangan acak kelompok karena rancangan tersebut memungkinkan untuk menyelidiki pengaruh dari dua jenis variabel atau lebih sekaligus. Kelompok perlakuan dibagi menjadi tiga, yaitu ; Kelompok I (tanpa radiasi sinar gamma), Kelompok II (diberi radiasi sinar gamma dosis tunggal (10 Gy)), Kelompok III (diberi radiasi sinar gamma dosis fraksinasi (5 x 2 Gy)).

**Tempat dan Waktu Penelitian.** Penelitian ini dilakukan di Laboratorium Farmakologi, Laboratorium Histologi, Laboratorium Patologi Anatomi Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya Malang dan di Instalasi Radiologi Rumah Sakit Saiful Anwar Malang pada bulan Mei 2012 s.d November 2013

**Sampel Penelitian.** Sampel penelitian adalah jaringan otak dari tikus *Rattus norveicus* varian Wistar jantan dibuat homogen dengan mempertahankan homogenitas strain, umur, berat badan, makanan, dan keadaan lingkungan sekitarnya sesuai dengan keperluan fisiologisnya.

**Jumlah Sampel Penelitian.** Perhitungan besar sampel menggunakan rumus berikut <sup>8</sup>:

$$(t-1) (r-1) \geq 15$$

Keterangan: t: banyaknya kelompok perlakuan  
r: jumlah replikasi

Berdasarkan rancangan penelitian yang akan dilakukan 3 macam perlakuan pada hewan coba, maka besar sampel penelitian dapat dihitung seperti berikut:

$$\begin{aligned} (3-1) (r-1) &\geq 15 \\ 2 (r-1) &\geq 15 \\ r-1 &\geq 15/2 \\ r-1 &\geq 7,5 \\ r &\geq 7,5 + 1 \\ r &\geq 8,5 \approx 9 \end{aligned}$$

Menurut perhitungan, besar sampel yang diperlukan untuk setiap kelompok adalah 9 ekor. Maka digunakan besar sampel minimal untuk penelitian eksperimental yaitu 27 ekor, dimana masing-masing kelompok perlakuan menggunakan 9 ekor hewan coba.

## Variabel penelitian

**Variabel bebas.** Variabel dosis iradiasi sinar gamma, yang diberikan terdiri atas 3 macam, yaitu:

- I : tanpa pemaparan radiasi
- II : radiasi dosis tunggal 10 Gy (1 x 10 Gy)
- III: radiasi fraksinasi dengan jumlah dosis total 10 Gy (5 x 2 Gy)

**Variabel tergantung.** Variabel tergantung dalam penelitian ini adalah efek biologi yang timbul akibat radiasi sinar gamma yang berupa ekspresi caspase 3 pada sel otak yang mengalami apoptosis.

**Definisi Operasional.** Radiasi dosis tunggal adalah pemberian radiasi dengan dosis 10 Gy dalam satu waktu.

Radiasi dosis fraksinasi adalah pemberian radiasi dengan dosis 2 Gy setiap hari dalam 5 hari, sehingga jumlah total dosis radiasi 10 Gy.

Apoptosis merupakan suatu mekanisme kematian sel secara fisiologis, atau disebut juga dengan "kematian sel terprogram". Apoptosis menjaga homeostasis pada diferensiasi dan proliferasi vertebra, dan bertanggung jawab untuk mengontrol jumlah sel dalam suatu jaringan dan menyingkirkan sel-sel yang mengancam kehidupan suatu organisme.

Apoptosis dilihat dengan metode imunohistokimia, lalu caspase-3 diamati dengan mikroskop cahaya dengan pembesaran 400x. Kriteria yang digunakan untuk menentukan sel yang mengalami apoptosis dengan memberikan ekspresi caspase-3 aktif akan menunjukkan warna coklat sedangkan yang tidak mengekspresikan akan berwarna biru pada inti selnya.

Sel otak adalah sel yang terdapat dalam struktur otak, terdiri atas sel neuron dan sel glia. Sel terbanyak di organ otak adalah sel glia. Sel glia terbagi menjadi tiga jenis, yaitu sel astroglia (astrostit), oligodendroglia (oligodendrosit), dan sel mikroglia.

**Analisis Data.** Variabel bebas berupa data nominal dan variabel tergantung berupa data numerik sehingga analisis statistik dilakukan dengan cara *One Way ANOVA* dengan menggunakan program SPSS 17. *One Way ANOVA* digunakan untuk menguji apakah rata-rata lebih dari dua kelompok sampel berbeda secara signifikan atau tidak, yaitu untuk kelompok sampel yang tidak diberi radiasi,

diberi radiasi dengan dosis tunggal, dan diberi radiasi dengan dosis fraksinasi. Variabel bebasnya adalah dosis radiasi sinar gamma dan variabel terganggunanya adalah jumlah morfologi sel otak yang mengalami apoptosis, kemudian dicari median dan standar deviasi (SD) dengan tingkat kepercayaan  $\alpha = 0,05$  dimana apabila diperoleh  $p > 0.05$  artinya tidak ada perbedaan yang nyata, sebaliknya bila  $p < 0.05$  menunjukkan ada perbedaan yang bermakna.

## HASIL PENELITIAN

### Data Hasil Penelitian

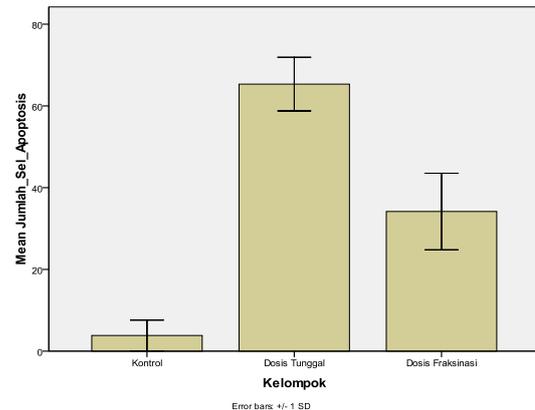
**Hasil Perhitungan Sel Otak yang Mengekspresikan Caspase-3.** Sediaan jaringan otak yang telah dilakukan pewarnaan imunohistokimia menggunakan antibodi caspase-3 selanjutnya diamati dengan mikroskop dengan perbesaran 400x. Pada tiap slide sediaan jaringan, jumlah sel yang diamati sebanyak 1000 sel. Dari 1000 sel ini, akan dihitung berapa sel yang positif mengekspresikan caspase-3 untuk kemudian dihitung persentasenya. Namun, selama pengecatan imunohistokimia sejumlah potongan jaringan terlepas dari sediaan. Jumlah sampel dari setiap kelompok penelitian berkurang sehingga hanya tersisa 6 slide pada tiap sediaan jaringan kelompok kontrol, kelompok tunggal, dan kelompok fraksinasi. Hasil perhitungan dapat dilihat pada tabel berikut ini:

**Tabel 1.** Rata-rata Jumlah Sel Otak yang Mengekspresikan Caspase-3

Sampel Otak	Jumlah Sel yang mengekspresikan Caspase-3		
	Kontrol	Dosis Tunggal	Dosis Fraksinasi
Ulangan 1	11	70	22
Ulangan 2	2	65	27
Ulangan 3	4	76	44
Ulangan 4	0	62	45
Ulangan 5	3	59	37
Ulangan 6	3	60	30
<b>REKATA ± SD</b>	<b>3,83 ± 3,764</b>	<b>65,33 ± 6,563</b>	<b>34,17 ± 9,368</b>

Berdasarkan hasil perhitungan sel di tiap sediaan, dapat diketahui bahwa pada perlakuan tikus kontrol penelitian ini didapatkan kematian sel rata-rata sebesar 3 sel. Pada tikus yang diberi dosis tunggal (1x10 Gy) mengalami kematian sel dengan rata-rata sebesar 65 sel. Pada tikus yang diberi

dosis fraksinasi (5x2 Gy) mengalami kematian sel rata-rata sebesar 34 sel.

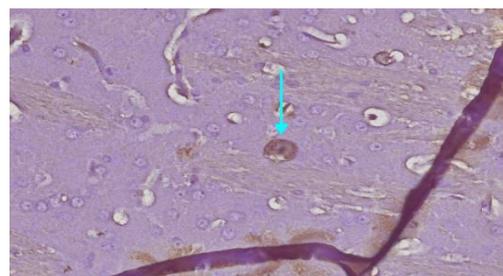


**Gambar 1.** Diagram rata-rata sel yang mengekspresikan caspase 3 pada tiap kelompok perlakuan.

### Pengamatan Mikroskopis pada Sediaan Jaringan Imunohistokimia.

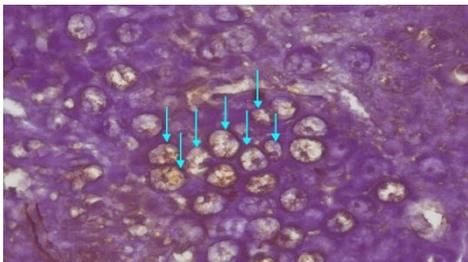
Pada pewarnaan imunohistokimia dilakukan penilaian terhadap ekspresi caspase 3 pada sel yang mengalami apoptosis. Sel otak yang mengekspresikan caspase-3 akan menunjukkan warna coklat pada sitoplasmanya. Namun, pada hasil pengecatan sediaan jaringan, warna coklat banyak tersebar, misal pada jaringan antar sel. Oleh karena itu, indikator sel yang mengalami apoptosis adalah sel yang mengekspresikan caspase-3 yakni sel yang memunculkan warna coklat pada sitoplasma saja. Hal ini bertujuan untuk mengurangi kesalahan perhitungan akibat *overstaining* pada proses pewarnaan imunohistokimia. Pengamatan sel otak pada penelitian ini menggunakan mikroskop cahaya perbesaran 400x.

Hasil dari kelompok yang tidak diberi radiasi sinar gamma, ditemui sel yang menunjukkan warna coklat pada sitoplasma. Sel yang ditunjuk merupakan salah satu contoh sel otak yang mengalami apoptosis dengan parameter caspase-3. Disekelilingnya sangat jelas terlihat sel yang sehat dan tidak mengalami apoptosis berwarna biru.



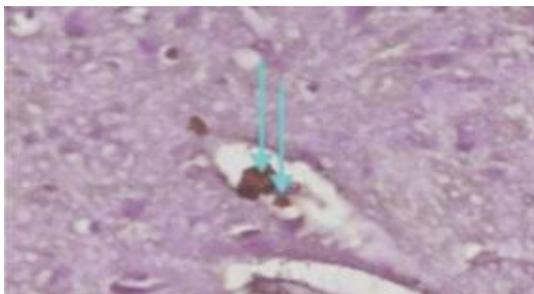
**Gambar 2.** Contoh ekspresi Caspase-3 pada salah satu ulangan Sel Otak Kelompok I.

Hasil pengamatan pada kelompok yang diberi radiasi sinar gamma dengan dosis tunggal sebesar 1 x 10 Gy. Tampak pada persebaran sel otak yang ditunjuk panah merupakan beberapa contoh sel yang mengalami apoptosis dengan parameter caspase-3. Hal ini terlihat dari dari gambaran yang khas pada sitoplasma sel otak yang berwarna coklat.



**Gambar 3.** Contoh ekspresi Caspase-3 pada salah satu ulangan Sel Otak Kelompok II.

Hasil pengamatan kelompok yang diberi radiasi sinar gamma dengan dosis fraksinasi sebesar 5 x 2 Gy, tampak pada sel yang ditunjuk panah adalah contoh gambaran sel yang mengalami apoptosis dengan parameter caspase-3. Sel tersebut memunculkan warna coklat pada sitoplasmanya.



**Gambar 4.** Contoh ekspresi Caspase-3 pada salah satu ulangan Sel Otak Kelompok III.

## DISKUSI

Berdasarkan hasil perhitungan rata-rata indeks apoptosis sel otak yang telah dibahas di bab sebelumnya, dapat diketahui bahwa terdapat peningkatan indeks apoptoisis sel otak pada kelompok yang diberi radiasi sinar gamma (kelompok tunggal dan fraksinasi) dibandingkan kelompok yang tidak diberi radiasi sinar gamma (kelompok kontrol). Melalui hasil penelitian ini pula dapat diketahui bahwa peningkatan indeks apoptosis sel otak pada kelompok yang diberi radiasi sinar gamma dosis fraksinasi 1x10 Gy (kelompok tunggal) lebih banyak daripada kelompok yang diberi radiasi sinar gamma dosis fraksinasi 5x2 Gy (kelompok fraksinasi). Hal ini bisa terjadi sesuai dengan penelitian Syaifudin pada

tahun 2007 bahwa dosis fraksinasi yang dipapar sinar gamma 2 Gy selama 5 hari memiliki kesempatan untuk memperbaiki kerusakan sel atau *DNA Repair* di tiap harinya. Berbeda dengan paparan dosis tunggal 10 Gy secara langsung tidak ada waktu setelahnya untuk memperbaiki kerusakan sel.

Analisis statistik penelitian ini dengan menggunakan uji *One-Way ANOVA*. Dari 27 sediaan organ otak yang diteliti, hanya 18 sediaan dengan jumlah sampel yang sama pada setiap kelompoknya yang bisa diteliti. Hal ini dikarenakan kegagalan pada saat proses pengecatan dan tidak bisa diulang. Meskipun besar sampel banyak berkurang, uji ANOVA tetap dapat dilakukan karena sesuai perhitungan, seluruh sampel lolos uji normalitas dan homogenitas dengan nilai  $p > 0,05$ . Berdasarkan hasil perhitungan analisis statistik ANOVA, dapat diketahui bahwa ternyata peningkatan tersebut berbeda secara signifikan dengan nilai  $p$  sebesar 0,000 ( $p < 0,05$ ). Artinya dengan sediaan yang hanya 18 buah sudah memberikan hasil yang signifikan, dan dapat diambil penilaian bahwa ada perbedaan jumlah sel apoptosi pasca terpapar sinar gamma dengan dosis perlakuan yang berbeda.

Setelah mengetahui bahwa rata-rata indeks apoptosis sel otak berbeda secara signifikan, dilakukan analisis *Tukey* dalam *Post Hoc Test* untuk mengetahui kelompok mana saja yang memiliki beda rata-rata secara nyata. Hasil analisis *Tukey* dalam *Post Hoc Test* menunjukkan bahwa baik kelompok kontrol dengan kelompok tunggal, kelompok kontrol dengan kelompok fraksinasi, maupun kelompok tunggal dengan kelompok fraksinasi, memiliki beda rata-rata yang signifikan dengan nilai  $p$  masing-masing sebesar 0,000 ( $p < 0,05$ ). Artinya didapatkan hasil penelitian yang berbeda dari tingkat kematian sel otak antar kelompok yang diperoleh setelah perlakuan.

Kelompok kontrol dengan kelompok tunggal, maupun kelompok kontrol dengan kelompok fraksinasi menunjukkan hasil beda rata-rata indeks apoptosis yang signifikan. Kondisi ini membuktikan bahwa radiasi sinar gamma dapat meningkatkan jumlah sel apoptosis pada sel otak. Hal ini sesuai dengan teori bahwa radiasi ionisasi (sinar gamma), menginduksi terjadinya kematian sel secara apoptosis. Kerusakan untai ganda DNA akibat pemaparan radiasi sinar gamma tersebut mengaktifasi gen p53 yang selanjutnya

mengaktivasi gen p21 yang merupakan protein cdk inhibitor sehingga secara langsung mensupresi aktivitas cdk dan menghentikan siklus sel pada fase G1 agar dapat dilakukan perbaikan DNA. Jika kerusakan DNA melebihi kapasitas sel untuk mengadakan perbaikan, maka akan mengaktivasi jalur apoptosis melalui serangkaian kaskade.

Hasil tersebut didukung oleh penelitian yang dilakukan oleh Hayashida, *et.al.* (2001). Penelitian tersebut bertujuan untuk mengidentifikasi berbagai abnormalitas jangka panjang pada tampilan makroskopis maupun mikroskopis otak 77 tikus wistar betina setelah dilakukan radiasi sinar-X dosis tunggal total 36 Gy (0,875 Gy/menit). Pemberian radiasi dilakukan secara lokal di atas kepala. Tikus diobservasi selama hingga minggu ke-60 setelah radiasi. Hasil penelitian tersebut mengungkapkan berbagai kelainan makroskopis dan mikroskopis pada otak tikus yang diamati. Kelainan makroskopis meliputi pucat pada serosa dan stenosis yang disertai dengan dilatasi proximal. Sedangkan perubahan histopatologis otak yang diradiasi adalah lesi kongesti dan edema setelah ada paparan sinar gamma.<sup>9</sup>

Sementara itu, hasil beda rata-rata indeks apoptosis dilihat dari sel yang mengekspresikan caspase-3 signifikan antara kelompok tunggal dengan kelompok fraksinasi, menunjukkan bahwa radiasi sinar gamma dosis tunggal terbukti dapat meningkatkan jumlah sel yang mengekspresikan caspase-3 pada sel otak dari pada dosis fraksinasi. Hal ini sesuai dengan hipotesis yang menyatakan bahwa radiasi sinar gamma menggunakan dosis tunggal menyebabkan ekspresi caspase-3 pada sel otak dosis tunggal lebih banyak dibandingkan dengan dosis fraksinasi. Teori yang mendasari hipotesis tersebut adalah teori *Split-Dose Repair* (SDR). Radiasi fraksinasi dianggap mampu meningkatkan *survival rate* dengan adanya jeda waktu antara penyinaran 2 dosis radiasi.<sup>10</sup> Peningkatan *survival rate* tersebut melalui 4 prinsip radiobiologis yakni reoksigenasi, perbaikan kerusakan sel subletal, redistribusi sel pada siklus sel, dan repopulasi sel yang mampu bertahan.<sup>11</sup>

Hasil penelitian ini sesuai dengan penelitian yang dilakukan oleh Bucci, *et.al* (2006) yang mengidentifikasi dampak pemberian radiasi ionisasi dosis tunggal (12,5 Gy) dan dosis fraksinasi (4 x 5 Gy) terhadap kultur sel astrositoma manusia. Pengamatan dilakukan pada 24 jam, 48 jam, dan 72 jam setelah pemberian radiasi ionisasi. Hasil

penelitian tersebut mengungkapkan bahwa radiasi dosis tunggal menyebabkan jumlah sel apoptosis lebih banyak daripada dosis fraksinasi. Kematian sel secara apoptosis tersebut melalui aktivasi caspase-3 akibat pembentukan ROS (*reactive oxygen species*).<sup>12</sup>

Penelitian tersebut juga mengungkapkan bahwa radiasi ionisasi dosis fraksinasi menginduksi kematian sel secara apoptosis sedangkan radiasi dosis tunggal menginduksi kematian sel secara nekrosis.<sup>12</sup> Pemberian radiasi ionisasi dosis besar tunggal menyebabkan sel yang mengalami hipoksia lebih banyak daripada dosis kecil terbagi. Sel hipoksia ini kemudian mengalami kematian sel diinduksi iskemia (*ischemic cell death*) atau dapat disebut juga dengan nekrosis.<sup>13</sup>

Selama pelaksanaan penelitian ada beberapa kendala yang baik langsung maupun tidak langsung mempengaruhi hasil penelitian kami. Berikut adalah faktor-faktor yang mempengaruhi penelitian. Metode fiksasi hewan coba kurang memadai pada saat proses penyinaran hewan coba menggunakan teleterapi Kobalt-60, hal ini dikarenakan alat fiksasi terbuat dari sekat kardus yang rentan geser dibagian bawahnya sehingga kemungkinan tikus berkumpul menjadi satu masih ada. Kondisi seperti ini ditakutkan sinar yang diarahkan tidak sampai mengenai organ otak karena tertutup oleh tikus lain, meskipun telah dilakukan penyesuaian *depth dose*. Saran agar tempat tikus pada saat penyinaran supaya lebih sempit dan licin lagi agar tikus susah untuk gerak dan terfiksasi dengan sempurna.

Selain itu, pada tahap perancangan penelitian, jumlah total sampel yang digunakan adalah sebanyak 27 sampel dengan masing-masing 9 sampel pada setiap kelompok perlakuan. Hal tersebut sesuai dengan hasil perhitungan rumus besar sampel. Namun pada akhir penelitian, jumlah total sampel tersisa 18 dengan masing-masing 6 sampel pada setiap kelompok. Sampel tersebut banyak berkurang karena saat proses pengecatan imunohistokimia menggunakan antibodi caspase-3 aktif, banyak potongan jaringan otak yang terlepas dari kaca objek. Hal ini bisa terjadi dikarenakan banyak variabel terutama pada rangkaian proses pembuatan sediaan jaringan dan pewarnaan imunohistokimia. Salah satu contoh yaitu organ terlalu lama berada dalam formalin 10%. Hal ini mempengaruhi kondisi organ karena tidak langsung diparafinkan, sehingga struktur otak

banyak yang rusak dan menjadi lebih mudah lepas pada saat pembuatan sediaan. Faktor-faktor yang mempengaruhi proses pewarnaan immunohistokimia antara lain penanganan jaringan (*tissue handling*), antibodi yang digunakan, dan protocol.<sup>14,15</sup>

Penanganan jaringan (*tissue handling*) dianggap sebagai faktor terpenting dalam menghasilkan pewarnaan immunohistokimia berkualitas, karena menjadi tahap awal dari serangkaian proses. Fiksasi jaringan menggunakan *Neutral Buffer Formalin* (NBF) 10% direndam dalam volume yang setara dengan 20-30x volume jaringan. Hal ini direkomendasikan karena mampu menghasilkan detail morfologis yang baik. Jaringan yang diambil harus segera difiksasi dalam waktu <24 jam pada suhu ruangan, karena makin lama penundaan dan makin tinggi suhu, akan meningkatkan autolisis jaringan sehingga merusak lokasi epitop. Ukuran spesimen yang difiksasi sebaiknya 3-5 mm untuk memudahkan penetrasi fiksator ke dalam jaringan. Data menunjukkan bahwa waktu optimal untuk fiksasi menggunakan formalin pada sebagian besar pewarnaan adalah 3-7 hari.

Pada saat pembuatan sediaan organ otak (pemotongan mikro) juga menjadi faktor penting lainnya dalam pewarnaan jaringan. Jaringan sebaiknya dipotong dengan ketebalan 3-4 mikron. Ukuran ini memungkinkan adhesi jaringan pada kaca objek yang digunakan. Kaca objek yang digunakan adalah kaca objek yang bermuatan positif seperti *poly L-lysine slides*. Pemakaian kaca objek untuk pengecatan HE (yang tidak bermuatan positif) meningkatkan kejadian terlepasnya organ pada pewarnaan immunohistokimia.

Setelah proses pembuatan sediaan selesai langkah yang tidak kalah pentingnya adalah pemilihan antibodi pada saat pewarnaan. Umumnya, antibodi dapat berupa antibodi monoklonal dan antibodi poliklonal. Antibodi poliklonal mampu berikatan dengan banyak epitop dan lebih sensitif, namun memiliki spesifisitas lebih rendah pada beberapa target sehingga dapat menimbulkan *false-positive*. Sebaliknya, antibodi monoklonal hanya berikatan pada 1 atau sebagian kecil epitop yang berkaitan dengan antigen tertentu. *False-negative* akan muncul apabila epitop rusak akibat kesalahan pada proses fiksasi, pemotongan, ataupun pewarnaan.

Protokol juga perlu ditentukan dengan pertimbangan yang tepat agar memperoleh hasil

pewarnaan optimal. Protokol biasanya disertakan dalam paket antibodi oleh produsen. Protokol tersebut meliputi pemilihan *epitope retrieval*, *blocking reagents*, dilusi antibodi, durasi inkubasi dan suhunya, dan metode deteksi yang tepat.

Pengamatan di bawah mikroskop cahaya sebaiknya dilakukan oleh lebih dari 1 orang untuk meminimalisasi subyektivitas penilaian pada sel yang diamati.

Modifikasi proses pewarnaan immunohistokimia pada penggunaan dosis antibodi caspase-3 aktif untuk menghindari *overstaining* dan terlepasnya potongan jaringan dari kaca objek sehingga hasil penelitian lebih akurat.

Perlu dilakukan penelitian serupa yang mengidentifikasi hubungan jenis dan besar dosis radiasi terhadap kematian sel secara nekrosis.

Pengembangan penelitian dengan menggunakan variabel, metode, dan parameter yang berbeda sehingga diperoleh hubungan antara jenis dosis radiasi dengan tingkat apoptosisnya.

## SIMPULAN

Pemberian radiasi sinar gamma kobalt-60, baik dosis tunggal 10 Gy (1x10 Gy) dan dosis fraksinasi 10 Gy (5x2 Gy) pada sel otak normal *Rattus norvegicus* varian wistar jantan mengekspresikan caspase-3 dengan jumlah yang lebih banyak dibanding sel otak kontrol (tidak diberi radiasi)

Pemberian radiasi sinar gamma dosis tunggal 10 Gy (1 x 10 Gy) dapat menyebabkan peningkatan persentase ekspresi caspase-3 pada sel otak yang lebih tinggi daripada pemberian radiasi sinar gamma dosis fraksinasi 10 Gy (5 x 2 Gy).

## DAFTAR PUSTAKA

1. Radiation Emergency Assistance Center Training Site. Guidance for Radiation Accident Management. 2013.
2. Moore AH, Olschowka JA, Williams JP, Paige SL, O'Banion MK. Radiation-induced edema is dependent on cyclooxygenase 2 activity in mouse brain. *National Center for Biotechnology Information*. 2004;161(2):153-60.
3. Rubin, P dan Casarett. G. W. *Clinical Radiation Pathology*. Philadelphia: W. B. Saunders. 1968.

4. Duran dan Dysko R. Molecular and Cellular Biology of Moderate-Dose (1-10 Gy) Radiation and Potential Mechanisms of Radiation Protection: Report of A Workshop at Bethesda, Maryland, December 17-18, 2001. *Radiation Research*, 2003; 159(6): 812-834.
5. Tehrani A, Abbas S, Mostan K, Navid H, Sasan M. Effect of Cobalt effect to the Rat Brain. *IDOSI Publication*, 2010;4(4): 396-399.
6. Kurita, H., Kawahara N, Asai A, Ueki K, Shin M, Kirino T. Radiation-induced apoptosis of oligodendrocytes in the adult rat brain. *National Center for Biotechnology Information*. 2001;23(8): 869-874.
7. Porter dan Janicke. Cell Kinetics and Radiation Pathology, *Experientia*. 1999;45(1):33-41.
8. Suyatno, F. Aplikasi Radiasi Sinar-X Di Bidang Kedokteran Untuk Menunjang Kesehatan Masyarakat.(Abstratc). BATAN. Yogyakarta. 2008.
9. Hayashida M, Shichijo K, Matsuu M, Minami K, Okimoto T, Nakayama T, Sekine I. Prolonged Radiation Damage in Rat Brain. *Acta Medical Nagasaki*. 2001;46:39-45.
10. Lawrence, R.C., dan Camphausen, K.A. Principles of Radiation Therapy, Cancer Management: A Multidisciplinary Approach. 2008.
11. Balzer-Kubicek EK. Apoptosis in Radiation Therapy: A Double-Edged Sword. *Exp Oncol*, 2012;34(3):277-85.
12. Bucci, Barbara, *et.al*. Fractionated Ionizing Radiation Exposure Induces Apoptosis through Caspase-3 Activation and Reactive Oxygen Species Generation. *Anti-cancer Research*. 2006;26:4549-4558.
13. International Atomic Energy Agency (IAEA). *Radiation Biology: A Handbook for Teachers and Students*. Training Course Series, No.42. Sales Promotion and Publising Section. Vienna. 2010.p.37.
14. Lackey, Misty. *Factors in IHC*. Official Publication of Michigan Society of Histotechnologies. 2011. (Online) (<http://www.mihisto.org/Resources/Documents/tp.40-03%5Bsu11%5Dihc.pdf>, diakses pada 10 November 2013).
15. Radolph-Habecker, Julie. *Tips About Fixation and Formalin*. Fred Hutchinson Cancer Research Center. 2013 (Online) (<http://sharedresources.fhcrc.org/training/tips-about-fixation-and-formalin>, diakses pada 7 November 2013).