

Efek Paparan Radiasi Gamma Terhadap Sel Hematopoietik pada Sumsum Tulang

Nurul Qomariyah^{1)*}, Muhaimin Rifa'i²⁾, Unggul P. Juswono³⁾

¹⁾ Program Studi Magister Fisika, Fakultas MIPA, Universitas Brawijaya, Malang

²⁾ Jurusan Biologi, Fakultas MIPA, Universitas Brawijaya, Malang

³⁾ Jurusan Fisika, Fakultas MIPA, Universitas Brawijaya, Malang

Diterima 2 Maret 2013, direvisi 15 April 2013

ABSTRAK

Radioterapi merupakan pengobatan kanker dengan menggunakan sumber radiasi eksternal yang bertujuan merusak DNA di inti kromosom sel kanker sehingga terjadi nekrosis. Apabila radiasi mengenai sumsum tulang belakang sebagai tempat pembentukan sel darah akan mengganggu sirkulasi sistem hematopoietik. Besarnya pengaruh radiasi gamma terhadap menurunnya kuantitas sel hematopoietik masih belum banyak diketahui sehingga perlu dilakukan telaah lebih lanjut untuk mengetahui efek paparan radiasi gamma dan pemberian ekstrak *P. niruri* terhadap menurunnya kuantitas sel hematopoietik yaitu sel CD34⁺ dan sel B220⁺ pada sumsum tulang. Pada penelitian ini digunakan lima variasi dosis radiasi yaitu, 100 rad, 200 rad, 300 rad, 400 rad, dan 500 rad serta pemberian ekstrak *P. niruri* menggunakan dosis tunggal yaitu 250 mg/kg BB. Dosis radiasi yang diberikan sebesar 100 rad per hari dan pemberian ekstrak *P. niruri* dilakukan selama 14 hari sebelum radiasi dan selama radiasi dilakukan. Jumlah dan analisis sel CD34⁺ dan B220⁺ pada sumsum tulang dihitung menggunakan Flow cytometer. Berdasarkan hasil penelitian didapatkan bahwa pemberian paparan radiasi gamma dapat menurunkan jumlah sel yang diamati, yaitu penurunan sel CD34⁺ dan sel B220⁺ seiring dengan besarnya dosis radiasi yang diberikan. Pemberian ekstrak *P. niruri* menghambat penurunan sel hematopoietik melalui peningkatan jumlah absolut sel CD34⁺ pada sumsum tulang.

Kata kunci: Radiasi Gamma, Hematopoietik, *Phyllanthus niruri* L.

ABSTRACT

Radiotherapy is a treatment for cancer which use external radiation sources with the aim to damage the DNA in the nucleus of the cancer chromosomes and cause necrosis of cancer cells. The exposure of radiation to the spinal cord as the site of blood cell formation would change the hematopoietic circulation system. The effect of gamma radiation exposure on decreasing of hematopoietic cells quantity is still unknown and it needs further experiment to determine the effect the radiation and the effect of *P. niruri* extract giving on the reduction of immune cells quantity which are CD34⁺ and B220⁺ cells in the bone marrow. In this experiment, five variations of the dose radiation was used. The dose were 100 rad, 200 rad, 300 rad, 400 rad and 500 rad and use single dose of *P. niruri* as much 250 mg/kg BB. The dose of 100 rad radiation was given daily and *P. niruri* extract was given for 14 days before and during radiation. The amount of the CD34⁺ and B220⁺ cells is counted and analyzed by Flow cytometry. The result of this experiment showed that the giving of gamma ray irradiation reduced the amount of immune cells in the bone marrow. The increasing radiation dose was caused increasing of the reduction of cells immune quantity. The giving of *P. niruri* extract inhibits hematopoietic cell through increasing of the absolut amount of CD34⁺ cell in the bone marrow.

Key word: Gamma Radiation, Hematopoietic, *Phyllanthus niruri* L.

*Corresponding author :

E-mail: nurulq_phy06@y7mail.com

PENDAHULUAN

Radioterapi merupakan radiasi yang dilakukan pada manusia (pasien), untuk keperluan diagnosis maupun terapi, khususnya terapi kanker. Tujuan utama radioterapi pada pengobatan kanker adalah rusaknya DNA (*deoxyribonucleic acid*) di inti kromosom sel kanker yang berakibat nekrosis sel atau hilangnya kemampuan sel melakukan aktivitas proliferasi [1]. Gangguan DNA akan menyebabkan kelainan atau perubahan pengaturan aktivitas sel. Radiasi sinar pengion yang mengenai DNA dapat menyebabkan berbagai kerusakan antara lain hidrosilasi (pecahnya basa timin dan sitosin), pembukaan inti purin dan pirimidin serta putusny gugus fosfat dari struktur siklisnya (rantai fosfodiester DNA) yang berakibat perubahan kimia. Kerusakan DNA akan menyebabkan penyimpangan pengaturan aktivitas seluler, yang pada akhirnya dapat menyebabkan kematian sel [2].

Kerusakan biologis pada sel normal merupakan bentuk efek samping yang dijumpai pada semua kasus radioterapi. Efek samping dini pada terapi kanker yang sangat merugikan penderita adalah menurunnya kuantitas dan kualitas sel-sel hematopoietik [3]. Ketika radiasi mengenai sumsum tulang sebagai tempat pembentukan sel darah maka menyebabkan penekanan proses pembentukan sel-sel darah sehingga mengakibatkan terjadinya penurunan sel stem/induk pada sumsum tulang [4].

Pada beberapa kasus penderita kanker seperti kanker rahim, prostat, dan kanker kolon yang mendapat pengobatan radiasi. Penyinaran kanker tersebut selain mengenai organ sasaran, juga melewati organ sumsum tulang belakang sebagai organ limfoid primer yang merupakan sumber sel induk hematopoietik. Beberapa macam sel imun yang bersirkulasi dalam sistem imun diproduksi didalam sumsum tulang. Oleh karena itu, efek negatif penurunan sel hematopoietik pada sumsum tulang harus dipertimbangkan agar pasien kanker yang mendapat terapi radiasi dapat mempertahankan sistem kekebalan tubuhnya

dan dapat mempertahankan serangan infeksi dari lingkungan luar.

Salah satu cara untuk mengatasi penurunan sel-sel hematopoietik pada sumsum tulang adalah dengan pemberian zat yang dapat meningkatkan respon imun yang disebut sebagai imunomodulator [5]. Beberapa tanaman diketahui dapat memberikan pengaruh terhadap kondisi sistem imunitas organisme. Hal ini yang mendasari pemanfaatan berbagai tanaman sebagai bahan obat alternatif. Beberapa tanaman obat memiliki potensi sebagai imunomodulator. Imunomodulator adalah obat yang dapat mengembalikan dan memperbaiki sistem imun yang fungsinya terganggu atau untuk menekan yang fungsinya berlebihan. Salah satu bahan alami yang dapat digunakan sebagai imunomodulator adalah *Phyllanthus niruri* L [6,7].

METODE PENELITIAN

Penelitian ini menggunakan mencit strain Balb/c jenis kelamin betina, umur 2 bulan dengan berat badan rata-rata 25 gr sebanyak 60 ekor. Herbal yang diuji adalah ekstrak meniran (*P.niruri*) yang didapatkan dari Balai Materia Medika Malang, dan paparan radiasi gamma menggunakan pesawat telecobalt 60 milik instalasi radiologi RSUD Dr. Saiful Anwar Malang. Perlakuan yang digunakan yaitu K (-) atau kelompok kontrol normal yaitu mencit yang tidak mendapat paparan radiasi dan tidak diberi ekstrak, K (+) untuk mencit yang hanya mendapat ekstrak *P. niruri*, kelompok RNE untuk mencit yang diradiasi tanpa ekstrak dan kelompok RE untuk mencit yang diradiasi dengan pemberian ekstrak. Pada masing-masing kelompok menggunakan 5 variasi dosis radiasi dan diberi ekstrak meniran dengan dosis tunggal yaitu 250 mg/kg BB.

Pemberian Ekstrak *P.niruri*. Simplisia ekstrak *P.niruri* didapatkan dari Balai Materia Medika Malang. Crude ekstrak *P. niruri* yang dimasukkan ke dalam tubuh mencit didasarkan pada berat badan mencit. Pemberian ekstrak *P. niruri* dilakukan dengan menggunakan sonde

lambung dengan cara dicekokkan ke mencit sesuai dengan dosis yang ditentukan yaitu 250 mg/kg BB satu kali sehari selama 14 hari setiap pagi hari sebelum mencit mendapat paparan radiasi dan selama mencit mendapat paparan radiasi.

Pemberian Paparan Radiasi Gamma.

Pada tahapan ini hewan coba untuk masing-masing kelompok perlakuan akan disinari sinar gamma dengan lima variasi dosis radiasi yaitu sebesar 100 rad, 200 rad, 300 rad, 400 rad dan 500 rad. Pemaparan radiasi dilakukan seluruh tubuh. Dosis radiasi yang diberikan adalah 100 rad untuk masing-masing mencit per hari. Kondisi penyinaran dengan SSD (*source to surface distance*) 80 cm dari permukaan, dengan luas lapangan penyinaran 10 cm x 10 cm.

Isolasi Sel. Isolasi sel dilakukan 24 jam setelah dilakukan paparan radiasi gamma. Sel diisolasi dari tulang femur dan tibia mencit. Tulang femur dan tibia mencit yang telah dibersihkan dari sisa jaringan otot yang menempel kemudian di flush dengan PBS menggunakan jarum 1 ml dan dihomogenkan dengan cara dipipeting. Sel-sel yang diperoleh disuspensi dengan PBS sampai 6 ml dan disaring menggunakan *wire* kedalam tabung propilen. Hasil yang diperoleh disentrifugasi dengan kecepatan 2500 rpm pada suhu 4°C selama 5 menit. Supernatan yang diperoleh dibuang dan pellet diresuspensi dengan PBS 1 ml. Selanjutnya dilakukan pipeting untuk mendapatkan homogenat. 200 µl homogenat dipindahkan pada tabung mikrosentrifuse baru dan ditambah 500 µl PBS. Sentrifuse kedua dilakukan pada 2500 rpm, suhu 4°C selama 5 menit sehingga didapatkan pellet yang akan diinkubasi dengan antibodi untuk proses analisis selanjutnya.

Analisis Flowcytometry. Analisis Flowcytometry dilakukan untuk mendeteksi populasi sel yang mengekspresikan sel CD34⁺ dan B220⁺. Sel-sel yang diisolasi dari sumsum tulang diinkubasi dengan antibodi selama 15 menit dalam *ice box*. Antibody yang digunakan yaitu *rat anti-mouse anti-CD34 PE conjugated* dan *rat anti-mouse anti-B220 PE conjugated*. Untuk menganalisis parameter yang diinginkan

dilakukan koneksi dengan komputer dan *flow cytometer* disetting pada keadaan *acquiring*. Sampel yang telah diinkubasi dengan antibodi ditambah 300 µl PBS dan ditempatkan pada kuvet flow cytometer. Flow cytometer akan menghitung jumlah sel total serta jumlah sel yang terdeteksi oleh label antibodi. Hasil yang diperoleh selanjutnya diolah dengan *BD cellquest Pro*TM.

Perhitungan Jumlah Sel. Perhitungan jumlah sel dilakukan dengan menggunakan *haemocytometer*. Suspensi sel hasil isolasi dalam PBS diwarnai dengan larutan pewarna *tryphan blue*, sel yang dihitung adalah sel hidup yang ditandai dengan tidak terwarnai oleh pewarna *tryphan blue*. Suspensi sel hasil isolasi diambil sebanyak 10 µl dan dimasukkan ke dalam microtube, selanjutnya ditambahkan 90 µl *tryphan blue* dan dihomogenkan. Penghitungan sel dilakukan terhadap sel hidup yang terdapat pada 5 kotak kecil *haemocytometer* menggunakan rumus sebagai berikut:

$$\Sigma = 5 \times \Sigma \text{ sel hitung} \times FP \text{ se} / \text{mm}^3 \times 10^4 \text{ se} / \text{ml} \quad (1)$$

HASIL DAN PEMBAHASAN

Dalam kondisi alamiah, penurunan jumlah komponen sel darah karena konsumsi makanan atau infeksi selalu dikembalikan ke dalam rentang jumlah yang normal melalui aktivitas pembelahan sel stem multipotensial (CD34⁺) yang berada dalam sumsum tulang. Radiasi menghambat aktivitas pembelahan sel stem tersebut bahkan dapat menghentikan sama sekali, bergantung pada dosis radiasi yang diterima. Dengan demikian akan terjadi penurunan jumlah sel darah secara cepat bergantung pada tingkat radiosensitivitasnya [4], sehingga respon dari suatu subpopulasi akan mempengaruhi fungsi subpopulasi lainnya yang akhirnya akan mempengaruhi respon imunitas tubuh [4]. Pemberian paparan radiasi gamma pada penelitian ini diketahui dapat menurunkan jumlah absolut sel pada organ limfoid primer yaitu sumsum tulang belakang karena terhambatnya produksi sel

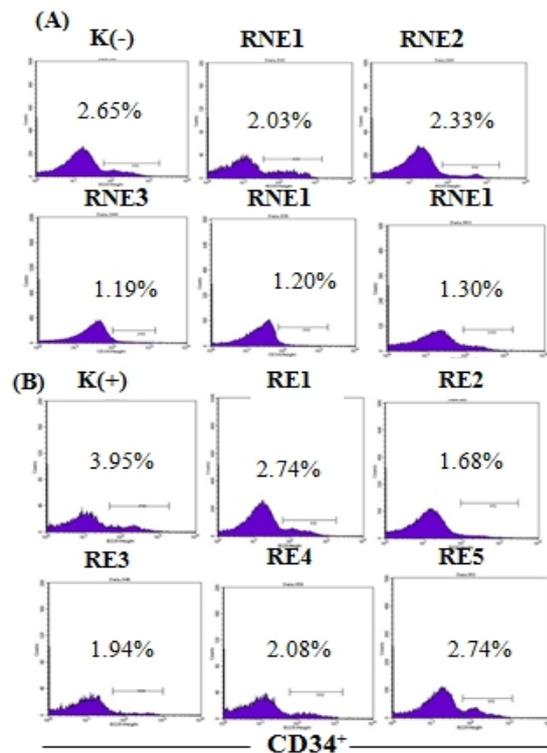
darah dalam sistem hemopoetik (hambatan mitosis pada sel induk).

Populasi Hematopoietik Stem Sel (CD34⁺) Pada Sumsum Tulang Pasca Radiasi. Semua sel yang membentuk komponen darah merah, platelet, dan sel darah putih yang terlibat dalam sistem imun berasal dari prekursor yang sama, yakni *hemotopoietic stem cells* (HSC) dalam sumsum tulang [8]. Kematian sel induk hemopoetik dalam sumsum tulang akibat paparan radiasi gamma akan mempengaruhi keadaan respon imunitas tubuh.

Penurunan jumlah sel induk hemopoetik (CD34⁺) akibat paparan radiasi pengion yang dihasilkan radioterapi menyebabkan pemecahan kovalen antara hidrogen dan oksigen. Radikal bebas OH^{*} mengoksidasi DNA sehingga rantai DNA pecah dan menyebabkan kerusakan kromosom sehingga terjadi perubahan metabolisme dan efek biologi sel pada tingkat mitosis (kerusakan struktur sel yang memicu apoptosis sel). Radiasi juga menimbulkan hambatan (produksi) dan perkembangan sel darah pada sumsum tulang [9]. Sel CD34⁺ pada sumsum tulang sangat sensitive terhadap paparan radiasi. Profil jumlah relative sel CD34⁺ berdasarkan flowcitometer terlihat pada Gambar 1.

Jumlah persentase *flowcytometri* hanya menggambarkan jumlah relatif sel yang terbaca pada alat *flowcytometri* ± 10.000 sel/sampel, sedangkan untuk mengetahui jumlah absolut sel di sumsum tulang dapat dilakukan perhitungan lebih lanjut menggunakan haemocytometer. Hasil pengamatan terhadap jumlah absolut sel CD34⁺ menunjukkan terjadi penurunan jumlah absolut sel CD34⁺ pada masing-masing kelompok perlakuan baik sebelum dan sesudah radiasi. Pada kelompok perlakuan radiasi tanpa ekstrak (RNE) untuk K(-) jumlah absolut sel CD34⁺ yaitu 1241175 sel/ml, pemberian dosis radiasi (100-200) rad mampu menurunkan jumlah absolut CD34⁺ berturut-turut sebesar ± 43% dan ±56% bila dibandingkan dengan K(-). Pemberian dosis radisasi 500 rad dapat

menurunkan jumlah absolut sel CD34⁺ sebesar ±82% seperti terlihat pada Gambar 2.

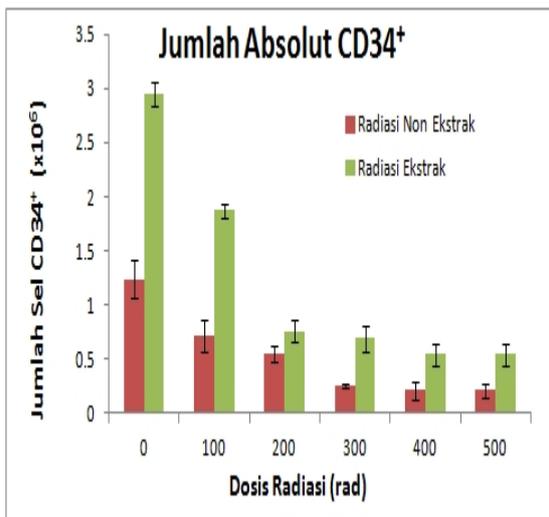


Gambar 1. Profil *Flowcytometry* sel CD34⁺ pada sumsum tulang mencit (A) pasca paparan radiasi (B) pasca paparan radiasi dengan pemberian ekstrak *P.niruri*. Mencit Balb/c diradiasi dengan variasi dosis 100 rad-500 rad.

Terdapat peningkatan jumlah sel CD34⁺ pada kelompok pemberian ekstrak *P.niruri* (RE) apabila dibandingkan dengan kelompok perlakuan (RNE). Pada kelompok K(+) mampu meningkatkan jumlah absolut pada kelompok perlakuan pemberian ekstrak sel CD34⁺ menjadi 2950880 sel/ml atau terjadi peningkatan sebesar ±138% bila dibandingkan K(-). Pada pemberian dosis radiasi 100 rad terjadi penurunan jumlah absolut CD34 ±36%. Pemberian dosis radiasi bertingkat yaitu (200-500) rad jumlah absolut sel CD34⁺ meningkat berturut-turut sebesar RE2 (39%), RE3 (171%), RE4 (155%), dan RE5 (157%) bila dibandingkan pada kelompok (RNE) dengan dosis radiasi yang sama. Dengan kata lain pada dosis radiasi sub letal

(500 rad) mampu memperkecil penurunan jumlah sel CD34⁺ mencapai ±56.4% bila dibandingkan K(-).

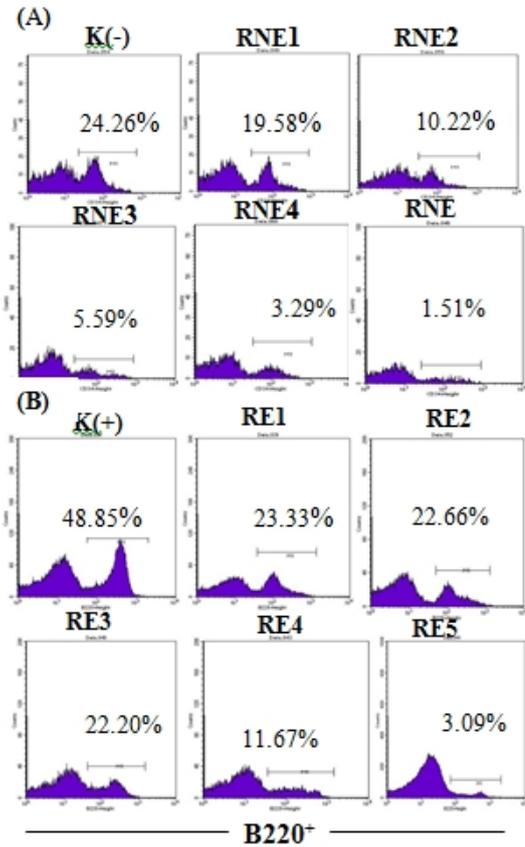
Sebagaimana diketahui kelangsungan hidup sel darah/hematopoietik sangat bergantung pada lingkungan atau sitokin seperti halnya *hematopoietic growth factor*. Berdasarkan hasil penelitian Nworu [10] mengungkapkan adanya senyawa aktif ekstrak *P. niruri* dapat mengaktifasi sitokin berupa interleukin-4 (IL-4), adanya IL-4 dapat mengatur hematopoiesis pada sumsum tulang, sehingga dimungkinkan meningkatnya jumlah absolut sel CD34⁺ setelah pemberian ekstrak *P. niruri* seperti terlihat pada Gambar 2 karena IL-4 dapat menstimulasi proliferasi sel CD34⁺. Senyawa aktif yang ditemukan pada meniran antara lain adalah triterpenoid, flavonoid, tanin, alkaloid, dan asam fenolat, sejalan dengan Tjandrawinata [11] bahwa adanya senyawa aktif flavonoid pada ekstrak *P. niruri* juga dapat menstimulasi peningkatan sel CD34⁺ pada sumsum tulang.



Gambar 2. Jumlah absolut sel CD34⁺.

Populasi Sel B220⁺ Pada Sumsum Tulang Pasca Radiasi. Sel B220⁺ merupakan sel yang mengekspresikan molekul permukaan B220⁺ (CD45R), molekul permukaan ini sering kali digunakan sebagai penanda untuk sel B yang berfungsi dalam hubungannya dengan

pembentukan antibodi. Adapun data hasil flowciter terhadap profil sel B220⁺.

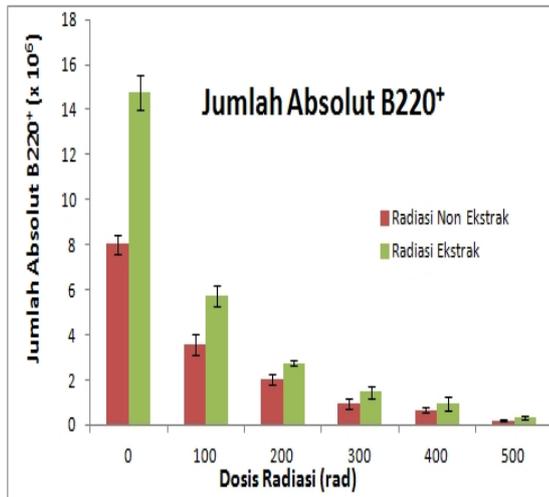


Gambar 3. Profil Flowcytometry sel B220⁺ pada sumsum tulang mencit (A) pasca paparan radiasi (B) pasca paparan radiasi dengan pemberian ekstrak *P. niruri*. Mencit Balb/c diradiasi dengan variasi dosis 100 rad-500 rad.

Penurunan populasi sel CD34⁺ berpengaruh terhadap penurunan sel B220⁺, hasil penelitian menunjukkan penurunan sel B220⁺ tersebut lebih tajam bila dibandingkan penurunan jumlah absolut sel CD34⁺ (HSC), selain disebabkan karena penurunan sel induk hal tersebut juga karena sel B yang belum matang bersifat sangat sensitif terhadap paparan radiasi gamma. Sel B bersifat lebih akut dan cepat menunjukkan kerusakan akibat radiasi dibandingkan sel T [11].

Berdasarkan data hasil perhitungan jumlah absolut sel B220⁺ (Gambar 4) penurunan jumlah sel semakin tajam seiring

dengan pemberian dosis paparan radiasi yang diberikan.



Gambar 4. Jumlah absolut sel B220⁺.

Pada kelompok K(-) jumlah absolut sel B220⁺ sebesar 8022465 sel/ml dan terjadi penurunan bertingkat sesuai dengan besarnya dosis radiasi yang diberikan berturut-turut. ±50.58%, 74.88%, 88.27%, 91.71%, dan 97.54% bila dibandingkan dengan K(-), sehingga jumlah absolut sel B220⁺ pada dosis radiasi tertinggi (500 rad) menjadi 197040 sel/ml atau bertahan sekitar ±2.5% bila dibandingkan dengan K(-).

Penurunan jumlah absolut sel B220⁺ juga terjadi pada kelompok radiasi ekstrak (RE) seiring dengan dosis paparan radiasi gamma yang diberikan. Pada kelompok K(+) jumlah absolut sel B220⁺ bernilai 14775600 sel/ml, terjadi peningkatan sebesar ±84% bila dibandingkan K(-). Akan tetapi pemberian ekstrak *P.niruri* tidak memberikan pengaruh secara nyata terhadap jumlah absolut sel B220⁺ pada mencit yang mendapatkan paparan radiasi gamma. Peningkatan jumlah absolut sel B220⁺ pada kelompok perlakuan dengan ekstrak *P.niruri* untuk lima variasi dosis radiasi berturut-turut sebesar 27.10%, 9.33%, 6.40%, 3.50% dan 1.41% bila dibandingkan dengan kelompok RNE pada tiap-tiap dosis radiasi yang sama. Peningkatan jumlah absolut sel B220⁺ pada kelompok perlakuan dengan ekstrak *P.niruri* atau kelompok radiasi ekstrak

(RE), tidak terlalu nyata disebabkan karena sel B220⁺ sangat sensitif terhadap paparan radiasi gamma.

KESIMPULAN

Paparan radiasi gamma pada organ limfoid primer yaitu sumsum tulang dapat menurunkan jumlah sel induk hematopoietik (CD34⁺) dan sel B220⁺ seiring dengan besarnya dosis radiasi yang diberikan dan sensitifitas masing-masing sel pada sumsum tulang. Sel B220⁺ lebih sensitif terhadap paparan radiasi bila dibandingkan dengan sel CD34⁺. Ekstrak *P.niruri* berperan sebagai agen imunomodulator yang dapat meningkatkan jumlah sel pasca paparan radiasi gamma. Pemberian ekstrak *P.niruri* pada penelitian ini dapat meningkatkan sel CD34⁺ pada sumsum tulang.

DAFTAR PUSTAKA

- [1] Tjokronagoro, M. (2001), *Biologi Sel Tumor Maligna*, Fakultas Kedokteran UGM, Yogyakarta.
- [2] Peres and Brady's. (1987), *Principle and Practice of Radiation Oncology*. Lippincott Williams & Wilkins, USA.
- [3] Geinitz, H., F. B. Zimmermann, et al (2001), Serum Cytokine Levels And Blood Cell Counts during Radiotherapy Of Patients With Breast Cancer, *Int J. Radiation Oncology Biologi.*, **51**, 691-698.
- [4] Zubaidah, A. (2002). Balara: Indikator Biologi Dari Kerusakan Pada Tubuh Akibat Pajanan Radiasi. Puslitbang Keselamatan Radiasi dan Biomedika Batan, Jakarta.
- [5] Abbas, A. K. and A. H. Lichtman. (2005), *Cellular and Molecular Immunology Fifth Edition*, Elsevier, Philadelphia.
- [6] Bratawidjaja, K. G. and I. Rengganis. (2010), *Imunologi Dasar*, Balai Penerbit FKUI, Jakarta.

- [7] Sunarno (2007), *The Effect of Phyllanthus niruri L in Neutrophil Percentages, Spleenic Bacterial Colonies and Liver Histopathology of Balb/C Mice Infected by Salmonella thypimurium*, Universitas Diponogero, Semarang, Tesis.
- [8] Rifa'i, M. (2011), *Autoimun dan Bioregulator*, UB Press, Malang.
- [9] Hoffbrand, A. V., J. E. Pettit, et al. (2005), *Hematology*, EGC Kedokteran, Jakarta.
- [10] Nworu, C. S., P. A. Akah, et al (2010), *The Effects Of Phyllanthus Niruri Aqueous Extract On The Activation Of Murine Lymphocytes And Bone Marrow-Devired Macrophages*, *Immunological Investigations.*, **39**, 245-267.
- [11] Tjandrawinata, R. R., S. Maat, et al (2005), *Effect of standardized Phyllanthus niruri extract on changes in immunologic parameters: correlation between preclinical and clinical studies*, *Medika* **6**, 367-371.
- [12] Maruyama, Y. and J. M. Feola (1987), *Relatif Randiosensitivities of Thymus, Limfa and Lymphohemopoietic Sistem. In advance in Radiation Biology*, *LET, J.T. and ALTMAN*, **12**, 1-70.