



Analisis Tingkat Kerusakan DNA pada Sel Limfosit Perokok dan Non Perokok Akibat Paparan Radiasi Gamma dengan Teknik *Comet Assay*

Ikhsana Nuri Astiti ^{✉1)}, Yustinus Ulung Anggraito²⁾, Mukh Syaifudin³⁾

Jurusan Biologi, Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Universitas Negeri Semarang, Indonesia

Info Artikel

Diterima: 1 Februari 2018

Disetujui: 1 Maret 2018

Dipublikasikan: 1 April 2018

Keywords:

comet assay; DNA damage; gamma radiation; lymphocytes; smoker

Abstrak

Radiasi gamma dan asap rokok diketahui memiliki potensi dalam memicu kerusakan DNA pada suatu sel, sehingga berpengaruh besar dalam mempengaruhi tingkat kerusakan DNA karena dapat memicu kerusakan DNA basal sehubungan dengan kerusakan genetik limfosit. Penelitian ini bertujuan untuk menganalisis pengaruh dosis radiasi gamma, status merokok, serta interaksi keduanya terhadap kerusakan DNA pada sel limfosit perokok dan non perokok dengan teknik *comet assay*. Penelitian ini merupakan penelitian eksperimen dengan rancangan kelompok lengkap teracak (RKLT) faktorial dua faktor yaitu dosis radiasi gamma dan status merokok. Analisis menggunakan *software CASP* dan uji Anova dua arah. Nilai *tail length* (TL) kelompok non perokok yaitu berkisar 4,59 hingga 129,15 μm dan berkisar 14,57 hingga 194,82 μm untuk perokok, nilai *tail moment* (TM) non perokok berkisar 0,11 hingga 51,73 μm dan berkisar 1,33 hingga 103,94 μm untuk perokok, sedangkan nilai *tail DNA* (TD) non perokok berkisar 1,84 hingga 30,88 μm dan berkisar 6,42 hingga 41,50 μm untuk perokok. Hasil uji Duncan nilai TL akibat dosis 6 Gy berbeda nyata dengan 8 Gy. Nilai TM akibat dosis 8 Gy berbeda nyata dengan dosis 0, 2, 4, dan 6 Gy. Nilai TD akibat dosis 6 dan 8 Gy berbeda nyata dengan dosis 0, 2, dan 4 Gy. Berdasarkan penelitian dapat disimpulkan bahwa dosis radiasi gamma berpengaruh sangat nyata terhadap nilai TL, TM, dan TD ($<0,01$), status merokok berpengaruh nyata terhadap nilai TL ($p<0,05$) dan tidak berpengaruh nyata terhadap nilai TM dan TD ($p<0,05$), sedangkan interaksi keduanya tidak berpengaruh nyata terhadap nilai TL, TM, dan TD ($p<0,05$).

Abstract

Gamma radiation and cigarette smoke is known have the potential to trigger DNA damage in a cell, so large influential in affecting level of DNA damage because can trigger DNA damage basal with respect to lymphocytes genetic damage. This study aims to analyze the effect of gamma radiation dose, smoking status and the interaction both against DNA damage in lymphocytes smokers and non-smokers with the comet assay technique. This was experimental research with complete randomized groups design (RKLT) factorial two factors which is dose of gamma radiation and smoking status. Analyzed to using software CASP and Anova test. Tail length (TL) value non-smokers range from 4,59 to 129,15 μm and range 14,57 to 194,82 μm for smokers group, tail moment (TM) value non-smokers range 0,11 to 51,73 μm and range 1,33 to 103, 94 μm for smokers group, while tail DNA (TD) value non-smokers range 1,84 to 30,88 μm and range 6,42 to 41,50 μm for smokers group. The results Duncan test TL value effect of dose 6 Gy significant different with dose 8 Gy. Tail moment (TM) value effect of dose 8 Gy significant different with dose 0, 2, 4, and 6 Gy. Tail DNA (TD) value effect of dose 6 and 8 Gy significant different with dose 0, 2, and 4 Gy. Based on this research, it could conclude that the dose of gamma radiation significant effect of TL, TM, and TD value ($<0,01$), smoking status significant effect of TL value ($p < 0,05$) and not significant effect of TM and TD value ($p < 0,05$), while the interaction both not significant effect of TL, TM, and TD value ($p < 0,05$).

© 2017 Universitas Negeri Semarang

[✉] Alamat korespondensi:
Gedung D6 Lt.1 Jl Raya Sekaran Gunugpati, Semarang
E-mail: ikhsananuri@yahoo.co.id

PENDAHULUAN

Radiasi pengion yang memapar tubuh manusia akan mengakibatkan terjadinya ionisasi dan menghasilkan radikal bebas yang secara kimia sangat reaktif, sehingga dapat menyebabkan kerusakan materi biologi dengan mengubah molekul-molekul penting dalam sel (Batan 2005).

Materi biologi yang pertama kali mengalami kerusakan akibat radiasi adalah DNA dan kromosom. Kerusakan DNA akibat paparan radiasi dapat berupa perubahan struktur molekul gula atau basa, pembentukan dimer, putusnya ikatan hidrogen antar basa, dan hilangnya gugus gula atau basa pada DNA. Kerusakan DNA lebih parah dapat berupa putusnya salah satu untai DNA disebut *single strand break* (SSB) dan putusnya kedua untai DNA pada posisi berhadapan disebut *double strand break* (DSB) (Hall & Giaccia 2012).

Radiasi gamma memiliki potensi dalam memicu kerusakan DNA sel limfosit. Berdasarkan hasil penelitian Miklos *et al.* (2009) terdapat perbedaan tingkat kerusakan DNA antara sel limfosit yang terpapar radiasi gamma dosis 4 Gy dan control yaitu sebesar $55,78 \pm 1,90 \mu\text{m}$ dan $16,19 \pm 0,27 \mu\text{m}$ untuk nilai tail length serta $5,06 \pm 0,27 \mu\text{m}$ dan $0,36 \pm 0,03 \mu\text{m}$ untuk nilai tail moment, dimana rerata nilai tail length dan tail moment kelompok yang terpapar dosis 4 Gy lebih besar dibandingkan kontrol.

Prevalensi merokok di Indonesia menurut *Global Adult Tobacco Survey* (GATS) cenderung mengalami peningkatan dari 34,2% pada tahun 2007, menjadi 36,3% pada tahun 2013 (*Office of Chief Economist* 2015). Proporsi jumlah perokok terbesar berada pada kelompok gender laki-laki (47,5%) dibanding perempuan (1,1%) (Trihono 2013).

Ketika merokok, sebanyak 4.000 bahan kimia yang bersifat racun seperti *carbon monoxide*, *hydrogen cyanide*, *arcenic*, *ammonia*, dan *acetone* akan terhirup, sehingga dapat menimbulkan penyakit (WHO 2006). Menurut Manikantan *et al.* (2010) merokok merupakan faktor yang berpengaruh besar dalam memicu terjadinya kerusakan DNA limfosit. Berdasarkan hasil penelitian Bacaksiz *et al.* (2013) kelompok perokok yang terpapar asap aspal memiliki nilai tail DNA lebih besar ($24,82 \pm 2,53 \mu\text{m}$) dibandingkan non perokok yang terpapar asap aspal ($23,00 \pm 2,96 \mu\text{m}$). Selain itu, menurut Hininger *et al.* (2004) tingkat kerusakan DNA 56% lebih besar pada kelompok perokok dibandingkan non perokok. Hal tersebut menunjukkan bahwa status merokok merupakan faktor pemicu kerusakan DNA.

Limfosit merupakan salah satu sel mamalia yang paling sensitif terhadap radiasi (radiosensitif) (IAEA 1997) karena secara terus-menerus melakukan regenerasi, sehingga mudah mengalami kerusakan DNA (USNRC). Faktor itulah yang menyebabkan limfosit seringkali digunakan dalam deteksi kerusakan DNA akibat radiasi. Menurut Holl *et al.* (2000) limfosit rentan terhadap kerusakan DNA, bahkan pada dosis rendah 0,02-0,1 Gy respon limfosit sudah dapat terdeteksi (Redon *et al.* 2009).

Serendah apapun dosis radiasi yang memapar sel tetap dapat menimbulkan efek biologi, karena suatu kejadian ionisasi dapat menyebabkan kerusakan DNA, sehingga diperlukan teknik yang dapat mendeteksi kerusakan DNA pada sel yaitu teknik *comet assay*. *Comet assay* atau *Single Cell Gel Electrophoresis* (SCGE) merupakan metode cepat dan sensitif untuk mendeteksi berbagai kerusakan DNA pada sel-sel individual yang disebabkan oleh berbagai agen genotoksik (Fairbairn *et al.* 1995).

Sebelum ditemukannya *comet assay*, analisis kromosom disentrik menjadi metode handal untuk mendeteksi efek biologi akibat radiasi (bioindikator) yang berhubungan dengan dosis, sehingga dapat mengetahui pada dosis berapa radiasi dapat memberikan efek biologi pada tubuh, namun metode tersebut hanya dapat melihat efek biologi pada tingkat kromosom (IAEA 2001). *Comet assay* dapat mendeteksi radiasi pengion pada dosis rendah 0,05 Gy, sedangkan kromosom disentrik baru dapat mendeteksi radiasi pengion pada dosis 0,1 Gy. Selain itu, *micronucleus* (MN) juga merupakan metode pilihan untuk mendeteksi kerusakan DNA, namun terbatas pada tingkat kromosom (Fenech *et al.* 1999; Fenech 2000). Berbeda dengan aberasi kromosom disentrik dan *micronucleus*, *comet assay* dapat mendeteksi kerusakan DNA sampai di tingkat sel individual. Keunggulan lain *comet assay* yaitu sampel limfosit yang dibutuhkan lebih sedikit, yaitu < 10.000 sel dibandingkan metode kromosom disentrik dan hampir semua sel eukariot dapat dianalisis dengan *comet assay*. Selain beberapa kelebihan di atas, teknik *comet assay* juga memiliki kelemahan yaitu

hanya mampu mendeteksi kerusakan DNA dalam bentuk patahan untai, serta harus memperoleh suspensi viabilitas sel tunggal mencapai > 70% (Singh *et al.* 1988).

Ada korelasi antara radikal bebas dalam asap rokok dan radiasi gamma terhadap peluang terjadinya kerusakan DNA, maka diperlukan penelitian mengenai deteksi kerusakan DNA limfosit dengan teknik *comet assay*, sehingga dapat mengetahui pengaruh pemberian radiasi gamma dosis bertingkat, status merokok, serta interaksi keduanya terhadap kerusakan DNA pada sel limfosit perokok maupun non perokok.

METODE

Penelitian ini dilaksanakan di Laboratorium Radiobiologi Molekuler dan Laboratorium *Fluorescence In Situ Hybridization* (FISH) Bidang Radiobiologi, Pusat Teknologi Keselamatan dan Metrologi Radiasi (PTKMR)-Badan Tenaga Nuklir Nasional (Batan) Jalan Lebak Bulus No 49 Jakarta Selatan 12440.

Sampel yang digunakan dalam penelitian ini terdiri dari enam orang pekerja radiasi, yaitu tiga orang perokok dan tiga orang non perokok, dengan kriteria inklusi di antaranya, berjenis kelamin laki-laki, tidak dalam kondisi sakit, dan bersedia sebagai probandus saat penelitian.

Penelitian ini merupakan penelitian eksperimental yang menggunakan rancangan kelompok lengkap teracak (RKLT) faktorial, dengan dua faktor yaitu paparan dosis radiasi gamma dan status merokok. Pada penelitian ini setiap sampel dibagi menjadi lima kelompok perlakuan yang yang diberi paparan radiasi gamma dosis 0, 2, 4, 6, dan 8 Gy (D1, D2, D3, D4, dan D5). Satu unit penelitian yaitu *slide* preparat dengan dua gel independen yang melekat pada setiap *slide* preparat.

Isolasi sel limfosit dilakukan dengan mengambil 5 ml sampel darah menggunakan *syring* dan dimasukkan ke dalam tabung *vacutainer* berheparin kemudian diradiasi. Sampel darah yang sudah diradiasi ditambahkan 2 ml PBS dan dikocok perlahan. Larutan yang telah tercampur dimasukkan sebanyak 3 ml ke dalam tabung yang berisi 3 ml *histopaque*, kemudian disentrifus dengan kecepatan 1500 rpm selama 31 menit sampai terbentuk empat lapisan (PBS, plasma, *buffy coat*, dan sel-sel darah). *Buffy coat* hasil sentrifus ditambahkan 5 ml PBS dan dikocok sampai homogen, kemudian disentrifus dengan kecepatan 1000 rpm selama 15 menit. Supernatan hasil sentrifus dibuang, sedangkan pelet diresuspensi dengan menambahkan 75 μ l RPMI.

Uji viabilitas dilakukan dengan menghitung sel menggunakan *counting chamber haemocytometer*. Sebanyak 5 μ l suspensi darah dicampur dengan 45 μ l *trypan blue* 0,4% (perbandingan 1 : 10), kemudian 10 μ l suspensi dimasukkan ke dalam *counting chamber haemocytometer* dan dihitung viabilitasnya menggunakan mikroskop binokuler.

Pembuatan preparat dilakukan dengan metode tiga lapis gel (*sandwich*). Lapisan dasar dibuat dengan menggunakan 0,5 gram *Normal Melting Point* (NMP) agarose 1%. Lapis kedua dibuat dengan menghomogenkan 10 μ l suspensi sel hasil isolasi dan 90 μ l *Low Melting Point* (LMP) Agarose 0,5%. Setelah tercampur, sebanyak 75 μ l suspensi sel (LMP dan sel) diteteskan pada *slide* tepat diatas gel lapisan pertama. Lapis ketiga dibuat dengan meneteskan 75 μ l *Low Melting Point* (LMP) agarose 0,5% tepat diatas gel lapisan kedua dan menutupnya dengan cover glass.

Lisis sel dilakukan dengan memasukkan *slide* ke dalam *staining jar*, kemudian menuangkan larutan lisis ke dalam *staining jar* sampai *slide* terendam sempurna. Setelah itu, *slide* yang terendam dalam *staining jar* disimpan di dalam lemari pendingin pada suhu 4 °C selama 1 jam.

Unwinding DNA dilakukan dengan memasukkan *slide* ke dalam *staining jar*, kemudian memasukkan larutan *unwinding DNA* ke dalamnya sampai *slide* terendam sempurna. Setelah itu, *slide* yang terendam dalam *staining jar* disimpan di dalam pendingin pada suhu 4 °C selama 40 menit.

Elektroforesis alkali dilakukan dengan memasukkan *slide* ke dalam bak elektroforesis, kemudian memasukkan 1209 ml larutan *unwinding DNA* ke dalamnya sampai *slide* terendam sempurna dalam larutan *unwinding*. Setelah itu, mengatur voltase elektroforesis pada voltase 25 Volt dan 300 A.

Neutralisasi dilakukan dengan cara merendam slide menggunakan larutan *Tris-base* dengan kandungan pH 7,5 pada suhu ruang selama 5 menit (pencucian dilakukan sebanyak 3 kali ulangan). Setelah itu, *slide*

difiksasi dengan cara mencelupkannya ke dalam larutan etanol 100% selama 3 detik. *Slide* yang sudah difiksasi kemudian diletakkan di dalam desikator selama semalam.

Pewarnaan dilakukan dengan meneteskan 75 μ l pewarna EtBr diatas *slide*, kemudian ditutup menggunakan *cover glass*. Pengamatan dilakukan di dalam ruangan gelap menggunakan mikroskop fluoresen dengan panjang gelombang $\lambda = 510\text{-}560$ dan perbesaran mikroskop 10 x 40.

Data kualitatif berupa gambaran citra komet dianalisis secara deskriptif dengan melakukan *scoring* visual yaitu membagi citra komet berdasarkan tingkat kerusakan DNA yang teramati ke dalam empat katergori (0 sampai 3). Data kuantitatif berupa nilai TL, TM, dan TD yang dihitung menggunakan *software* CASP, selanjutnya dianalisis menggunakan Microsoft Excel dan *software SPSS 20,0 for windows* dengan uji Anova (*analysis of variance*).

HASIL DAN PEMBAHASAN

Hasil penelitian tingkat kerusakan DNA pada limfosit perokok dan non perokok dengan variasi dosis radiasi gamma (0, 2, 4, 6, 8 Gy) dapat dilihat melalui tiga parameter yaitu, *tail length* (TL), *tail moment* (TM), dan *tail DNA* (TD) (Tabel 1).

Berdasarkan data pada Tabel 1 dapat terlihat bahwa nilai TL, TM, dan TD bervariasi pada berbagai perlakuan dosis radiasi gamma baik pada limfosit perokok maupun non perokok. Hal tersebut menunjukkan bahwa tingkat kerusakan DNA yang terjadi juga bervariasi. Untuk mengetahui pengaruh dosis, status merokok, serta interaksi keduanya terhadap kerusakan DNA (nilai TL, TM, dan TD), maka data diuji dengan analisis varian dua arah.

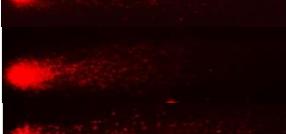
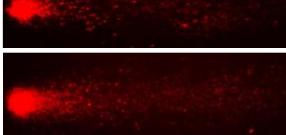
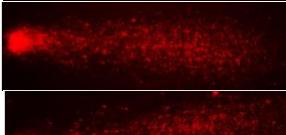
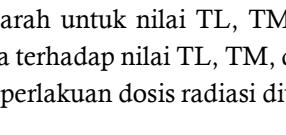
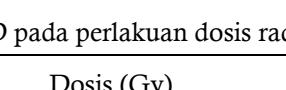
Tabel 1. Tingkat kerusakan DNA pada limfosit perokok dan non perokok dengan pemberian berbagai dosis radiasi gamma

Parameter	Status Merokok	Dosis (Gy)				
		0	2	4	6	8
TL	NP	4,59	13,25	35,31	84,01	129,15
	P	14,57	28,65	58,54	110,02	194,82
TM	NP	0,11	0,94	5,11	21,13	51,73
	P	1,33	5,23	9,87	30,06	103,94
TD	NP	1,84	5,69	10,42	20,63	30,88
	P	6,42	13,43	13,98	21,98	41,50

Hasil penelitian menunjukkan bahwa nilai TL, TM, TD cenderung mengalami peningkatan mulai dari perlakuan dosis 0, 2, 4, 6, dan 8 Gy baik pada sel limfosit perokok maupun non perokok. Hal tersebut sesuai dengan hasil analisis varian dua arah bahwa terdapat pengaruh sangat nyata pemberian dosis radiasi gamma terhadap nilai TL, TM, dan TD, status merokok berpengaruh nyata terhadap nilai TL dan tidak nyata terhadap nilai TM dan TD, sedangkan interaksi antara dosis radiasi gamma dan status merokok tidak berpengaruh nyata terhadap nilai TL, TM, dan TD. Selain itu, terdapat perbedaan antara nilai TL, TM, dan TD pada kelompok perokok dengan non perokok, dimana pada kelompok perokok lebih besar dibandingkan dengan non perokok, sehingga dapat dikatakan bahwa kerusakan DNA yang terjadi pada limfosit perokok jauh lebih parah dibandingkan dengan kerusakan DNA yang terjadi pada limfosit non perokok.

Perbedaan tingkat kerusakan DNA antara kelompok perokok dan non perokok tersebut juga dapat terlihat melalui migrasi DNA dan tingkat kerusakan pada gambaran visualisasi (Tabel 2) yang menunjukkan bahwa semakin besar paparan dosis radiasi gamma, maka ekor komet yang terbentuk akan semakin panjang sedangkan kepala komet semakin berukuran kecil. Pada dosis 4 Gy migrasi DNA yang terjadi pada kelompok perokok sudah masuk dalam kategori tinggi, sedangkan migrasi DNA kategori tinggi pada kelompok non perokok baru terlihat pada dosis 6 Gy, sehingga menyebabkan nilai TL, TM, dan TD pada kelompok perokok lebih besar dibandingkan kelompok non perokok.

Tabel 2. Hasil visualisasi citra komet limfosit perokok dan non perokok pasca pemberian radiasi gamma pada perbesaran 400x

Dosis (Gy)	Status Merokok	Hasil Visualisasi	Migrasi DNA	Tingkat Kerusakan
0	NP		Tidak ada migrasi	0
	P		Tidak ada migrasi	0
2	NP		Rendah	1
	P		Sedang	2
4	NP		Sedang	2
	P		Tinggi	3
6	NP		Tinggi	3
	P		Tinggi	3
8	NP		Tinggi	3
	P		Tinggi	3

Keterangan:

NP: Non perokok

P: Perokok

Hasil analisis varian dua arah untuk nilai TL, TM, dan TD menunjukkan bahwa perlakuan dosis radiasi gamma berpengaruh nyata terhadap nilai TL, TM, dan TD pada taraf kepercayaan 95%. Oleh karena itu, nilai TL, TM, dan TD akibat perlakuan dosis radiasi diuji lanjut dengan uji jarak ganda duncan (UJGD).

Tabel 3. Hasil perhitungan UJGD pada perlakuan dosis radiasi untuk nilai TL

Duncan ^{a,b}	Dosis (Gy)	Hasil UJGD
	0	9,58 ^a
	2	20,95 ^a
	4	46,93 ^a
	6	97,01 ^b
	8	161,99 ^c

Hasil UJGD menunjukkan bahwa nilai TL tertinggi terjadi akibat perlakuan dosis radiasi 8 Gy, sedangkan nilai TL terendah terjadi akibat perlakuan dosis radiasi 0 Gy. Hal tersebut menunjukkan bahwa kerusakan DNA yang terjadi lebih besar secara signifikan akibat radiasi gamma dosis 8 Gy. Berdasarkan hasil UJGD juga dapat terlihat bahwa nilai TL akibat pemberian radiasi gamma dosis 0, 2, dan 4 Gy tidak berbeda nyata, untuk dosis 6 dan 8 Gy berbeda nyata dengan dosis 0, 2, dan 4 Gy, selain itu untuk dosis 6 Gy juga berbeda nyata dengan dosis 8 Gy.

Tabel 4. Hasil perhitungan UJGD pada perlakuan dosis radiasi untuk nilai TM

Duncan ^{a,b}	Dosis (Gy)	Hasil UJGD
	0	0,72 ^a
	2	3,08 ^a
	4	7,49 ^a
	6	25,59 ^a
	8	77,84 ^b

Hasil UJGD menunjukkan bahwa nilai TM tertinggi terjadi akibat perlakuan dosis radiasi 8 Gy, sedangkan nilai TM terendah terjadi akibat perlakuan dosis radiasi 0 Gy. Hal tersebut menunjukkan bahwa kerusakan DNA yang terjadi lebih besar secara signifikan akibat radiasi gamma dosis 8 Gy. Berdasarkan hasil UJGD juga dapat terlihat bahwa nilai TM akibat pemberian radiasi gamma dosis 0, 2, 4, dan 6 Gy tidak berbeda nyata, sedangkan untuk dosis 8 Gy berbeda nyata dengan dosis 0, 2, 4, dan 6 Gy.

Tabel 5. Hasil perhitungan UJGD pada perlakuan dosis radiasi untuk nilai TD

Duncan ^{a,b}	Dosis (Gy)	Hasil UJGD
	0	4,13 ^a
	2	9,56 ^a
	4	12,20 ^a
	6	21,30 ^b
	8	36,19 ^c

Hasil UJGD menunjukkan bahwa nilai TD tertinggi terjadi akibat perlakuan dosis radiasi 8 Gy, sedangkan nilai TD terendah terjadi akibat perlakuan dosis radiasi 0 Gy. Hal tersebut menunjukkan bahwa kerusakan DNA yang terjadi lebih besar secara signifikan akibat radiasi gamma dosis 8 Gy. Berdasarkan hasil UJGD juga dapat terlihat bahwa nilai TD akibat pemberian radiasi gamma dosis 0, 2, dan 4 Gy tidak berbeda nyata, untuk dosis 6 dan 8 Gy berbeda nyata dengan dosis 0, 2, dan 4 Gy, selain itu untuk dosis 6 Gy juga berbeda nyata dengan dosis 8 Gy.

Pengaruh dosis radiasi gamma terhadap nilai TL, TM, dan TD

Berdasarkan hasil penelitian pemberian dosis radiasi gamma berpengaruh nyata terhadap nilai TL, TM, maupun TD, sehingga ditemukan peningkatan nilai TL, TM, dan TD akibat dosis radiasi gamma baik pada kelompok perokok maupun non perokok. Semakin meningkatnya dosis radiasi gamma maka nilai TL, TM, dan TD cenderung mengalami peningkatan. Hal tersebut menunjukkan bahwa peningkatan dosis radiasi gamma mempengaruhi tingkat kerusakan DNA yang terjadi pada sel limfosit. Kerusakan DNA pada sel limfosit yang disebabkan oleh paparan radiasi gamma merupakan akibat dari interaksi *physiochemical* antara radiasi pengion dengan DNA (Tice *et al.* 2000).

Terjadinya kenaikan nilai TL, TM, dan TD seiring meningkatnya dosis radiasi gamma tersebut mengindikasikan bahwa kerusakan DNA yang terjadi pada sel limfosit semakin bertambah parah seiring meningkatnya perlakuan dosis radiasi gamma. Semakin tinggi dosis radiasi gamma maka energi yang dihasilkan akan semakin besar, sehingga kemampuan untuk menembus materi sel jauh lebih besar. Oleh karena itu, tingkat migrasi sel akan meningkat kemudian mengakibatkan ekor komet memanjang serta meningkatnya momen ekor komet dan persentase DNA pada ekor yang akan berpengaruh pada peningkatan nilai TL, TM, dan TD.

Untai ganda pada DNA yang secara umum memiliki struktur berpilin sangat kompak akan menjadi sedikit mengendur di sekitar daerah DSB dari DNA. Molekul DNA mengandung gugus fosfat bermuatan listrik negatif saat berada pada larutan alkali, sehingga daerah pada untai ganda DNA yang mengalami pengenduran dan mengandung DSB akan bermigrasi menuju kutub positif (anoda) saat elektroforesis. Migrasi tersebut nantinya akan membentuk ekor komet, sedangkan daerah yang tidak mengalami pengenduran membentuk kepala komet tanpa terbentuk ekor (Rojas *et al.* 1999).

Pengaruh status merokok terhadap nilai TL, TM, dan TD

Berdasarkan hasil yang diperoleh status merokok berpengaruh nyata terhadap nilai TL, sementara untuk nilai TM dan TD tidak berpengaruh nyata, namun ditemukan adanya perbedaan rerata nilai TL, TM, maupun TD antara kelompok perokok dengan non perokok. Rerata nilai TL, TM, dan TD pada kelompok perokok lebih besar dibandingkan dengan non perokok (Tabel 1). Perbedaan kerusakan DNA antara perokok dan non perokok juga dapat terlihat melalui migrasi DNA dan tingkat kerusakan pada gambaran visualisasi (Tabel 2). Pada dosis 4 Gy migrasi DNA yang terjadi pada kelompok perokok sudah masuk dalam kategori tinggi, sedangkan migrasi DNA kategori tinggi pada kelompok non perokok baru terlihat pada dosis 6 Gy, sehingga menyebabkan nilai TL, TM, dan TD pada kelompok perokok lebih besar dibandingkan non perokok. Hal tersebut menunjukkan bahwa status merokok mempengaruhi tingkat kerusakan DNA yang terjadi pada sel limfosit.

Tingginya migrasi DNA pada ekor komet yang terbentuk dan tingginya rerata nilai TL, TM, dan TD pada kelompok perokok dibandingkan non perokok tersebut mengindikasikan bahwa kerusakan DNA yang terjadi pada sel limfosit perokok jauh lebih parah dibandingkan dengan sel limfosit non perokok. Hal tersebut disebabkan karena asap rokok diketahui mengandung banyak karsinogen, dengan polisiklik hidrokarbon aromatik (PAH), amina aromatik, N-nitrosamin dan aldehida mewakili utama kelas zat berbahaya (Hecht 1999; Stabbert *et al.* 2003). Kerusakan DNA akibat rokok disebabkan oleh radikal bebas yang dihasilkan dari asap rokok (Ferger *et al.* 1998; Wetscher *et al.* 1995), sehingga kebiasaan merokok sejauh ini merupakan faktor yang paling potensial dalam mempengaruhi panjang ekor komet, dimana tingkat migrasi DNA meningkat hingga 10% pada limfosit perokok (Betti *et al.* 1995).

Pengaruh interaksi antara dosis radiasi gamma dan status merokok terhadap nilai TL, TM, dan TD

Berdasarkan hasil yang diperoleh interaksi antara dosis radiasi gamma dan status merokok tidak berpengaruh nyata terhadap nilai TL, TM maupun TD, namun ditemukan adanya tingkat kerusakan DNA yang lebih besar pada kelompok perokok setiap penambahan dosis radiasi gamma. Hal tersebut menunjukkan bahwa adanya interaksi antara dosis radiasi gamma dan status merokok dalam mempengaruhi tingkat kerusakan DNA, namun interaksi tersebut tidak berpengaruh secara nyata. Hal ini diduga karena jumlah sampel yang digunakan dalam jumlah yang sedikit.

Oleh karena itu, untuk penelitian selanjutnya disarankan untuk menggunakan sampel yang lebih banyak lagi sehingga hasil yang diperoleh jauh lebih valid, seperti halnya penelitian Giovannelli *et al.* (2002) yang menyebutkan bahwa tidak adanya pengaruh nyata riwayat merokok terhadap kerusakan DNA oksidatif ($p=0,89$) diduga disebabkan karena sedikitnya jumlah perokok dalam sampel (16,9%), namun menurut Adem *et al.* (2013) apabila terdapat perbedaan atau variabilitas hasil penelitian terutama disebabkan karena perbedaan sensitivitas dan kondisi laboratorium tempat uji serta faktor manusianya.

SIMPULAN

Dosis radiasi gamma berpengaruh sangat nyata terhadap nilai TL, TM, dan TD. Status merokok berpengaruh nyata terhadap nilai TL, sementara untuk nilai TM dan TD tidak berpengaruh nyata, sedangkan interaksi antara dosis radiasi gamma dan status merokok tidak berpengaruh nyata terhadap nilai TL, TM, dan TD.

DAFTAR PUSTAKA

- Andem AB, Agbor RB & Ekpo IA. 2013. Review on Comet Assay: A reliable tool for assessing DNA damage in animal models. *J Curr Res Sci* 1(6): 405-427.
- Bacaksiz A, Kayaalti Z, Soylemez E, Tutkun E & Soylemezoglu T. 2013. Lymphocyte DNA damage in Turkish asphalt workers detected by the comet assay. *J Environ Health Res* 24(1): 11-17.
- Batan. 2005. *Pengenalan radiasi*. Pusat Pendidikan dan Pelatihan. Tersedia <http://www.batan.go.id/> [diakses pada 03-6-2015].

- Betti C, Davini T, Giannessi L, Loprieno N & Barale R. 1995. Comparative studies by comet test and SCE analysis in human lymphocytes from 200 healthy subjects. *Mutat Res* 343:201-207.
- Fairbairn DW, Olive PL & O'Neill KL. 1995. The comet assay: A comprehensive review. *Mutat Res* 339: 37-59.
- Fenech M, Holland N, Chang WP, Zeiger E & Bonassi S. 1999. The human micronucleus project - an international collaborative study on the use of the micronucleus technique for measuring dna damage in humans. *Mutat Res* 428: 271-283.
- Fenech M. 2000. The in vitro micronucleus technique. *Mutat Res* 455: 81-95.
- Ferger B, Spratt C, Earl CD, Teismann P, Oertel WH & Kuschinsky K. 1998. Effects of nicotine on hydroxyl free radical formation in vitro and on MPTP-induced neurotoxicity in vivo. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch Pharmacol* 358: 351-359.
- Giovannelli L, Saieva C, Masala G, Testa G, Salvini S, Pitzozzi V, Riboli E, Dolara P & Palli D. 2002. Nutritional and lifestyle determinants of DNA oxidative damage: A study in a mediterranean population. *Carcinogenesis* 23(9): 1483-89.
- Hall EJ & Giaccia AJ. 2012. *Radiotherapy for the radiologist*. 7th Edition. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins. Tersedia <https://www.scribd.com/doc/252571940/Radiotherapy-for-the-Radiologist-7E-2012-PDF-United> VRG [diakses pada 19-4-2016].
- Hecht S. 1999. Tobacco smoke carcinogens and lung cancer. *J Natl Cancer Institute* 91: 1194-1210.
- Hininger I, Chollet-Namy A, Sauvaigo S, Osman M, Faure H, Cadet J, Favier A & Roussel AM. 2004. Assessment of DNA damage by comet assay on frozen total blood: method and evaluation in smokers and non-smokers. *Mutat Res* 558: 75-80.
- Holl V, Coelho D, Weltin D, Denis JM, Dufour JP, Gueulette J & Bischoff P. 2000. Ex vivo determination of the effect of whole-body exposure to fast neutrons on murine spleen cell viability and apoptosis. *Rad Res* 154: 301-306.
- IAEA. 2001. Cytogenetic analysis for radiation dose assessment. *Technical Report Series*.
- IAEA. 1997. *Effect of ionizing radiation on blood and blood components: A survey*. IAEA-TECDOC-934.
- Manikantan P, Balachandar V, Sasikala K & Mohanadevi S. 2010. Lymphocyte DNA damage in chewing tobacco users of Coimbatore, Tamilnadu by using comet assay. *J Hum Ecol* 31(1): 53-58.
- Miklos M, Gajski G & Garaj V. 2009. Usage of the standard and modified comet assay in assessment of DNA damage in human lymphocytes after exposure to ionizing radiation. *Radiol Oncol* 43(2): 97-107.
- Office of Chief Economist. 2015. Rokok (cigarette). *industry update* 14.
- Redon CE, Dickey JS, Bonner WM & Sedelnikova OA. 2009. γ -H2AX as a biomarker of DNA damage induced by ionizing radiation in human peripheral blood lymphocytes and artificial skin. *Adv Space Res* 43 (8):1171-1178.
- Rojas E, Lopez MC & Valverde M. 1999. Single cell gel electrophoresis assay: methodology and applications. *J Chromatogr B* 772(1-2): 225-54.
- Singh NP, McCoy MT, Tice RR & Schneider EL. 1988. A simple technique for quantitation of low levels of DNA damage in individual cells. *Experimental Cell Research* 175(1): 184-191.
- Stabbert R, Voncken P, Rustemeier K, Haussmann HJ, Roemer E, Schaffernicht H & Patskan G. 2003. Toxicological evaluation of an electrically heated cigarette. part 2: chemical composition of mainstream smoke. *J Appl Toxicol* 23: 329-339.
- Tice RR, Agurell E, Anderson D, Burlison B, Hartmann A, Kobayashi H, Miyame Y, Rojas E, Ryu JC & Sasaki YF. 2000. Single cell gel/comet assay: guidelines for *in vitro* and *in vivo* genetic toxicology testing. *Envir Mol Mutagen* 35: 206-221.
- Trihono. 2013. *Riset kesehatan dasar*. Kementerian Kesehatan RI: Badan Penelitian dan Pengembangan Kesehatan. USNRC. Biological effects of radiation. *Reactor Concepts Manual*: Technical Training Center.
- Wetscher GL, Bagchi M, Bagchi D, Perdikis G, Hinder PR, Glaser K & Hinder RA. 1995. Free radical production in nicotine treated pancreatic tissue. *Free Radic Biol Med* 18: 877-882.
- WHO. 2006. Tobacco: deadly in any form or disguise. *World No Tobacco Day*.