

4-30-2011

Analisis Adduct DNA Setelah Pemberian Natrium Nitrit dan Dimetilamin Secara Berulang Pada Tikus

Sherly Meilianti

Universitas Indonesia FMIPA, Departemen Farmasi

Yahdiana Harahap

Universitas Indonesia FMIPA, Departemen Farmasi, yahdiana03@yahoo.com

Hayun Hayun

Universitas Indonesia FMIPA, Departemen Farmasi

Follow this and additional works at: <https://scholarhub.ui.ac.id/mik>



Part of the [Natural Products Chemistry and Pharmacognosy Commons](#), [Other Pharmacy and Pharmaceutical Sciences Commons](#), and the [Pharmaceutics and Drug Design Commons](#)

Recommended Citation

Meilianti, Sherly; Harahap, Yahdiana; and Hayun, Hayun (2011) "Analisis Adduct DNA Setelah Pemberian Natrium Nitrit dan Dimetilamin Secara Berulang Pada Tikus," *Majalah Ilmu Kefarmasian*: Vol. 8 : No. 1 , Article 3.

DOI: 10.7454/psr.v8i1.3470

Available at: <https://scholarhub.ui.ac.id/mik/vol8/iss1/3>

This Original Article is brought to you for free and open access by the Faculty of Pharmacy at UI Scholars Hub. It has been accepted for inclusion in *Majalah Ilmu Kefarmasian* by an authorized editor of UI Scholars Hub.

ANALISIS ADDUCT DNA SETELAH PEMBERIAN- NATRIUM NITRIT DAN DIMETILAMIN SECARA BERULANG PADA TIKUS

Sherly Meilianti, Yahdiana Harahap, Hayun
Universitas Indonesia FMIPA, Departemen Farmasi

ABSTRACT

Nitrosodimethylamine is a carcinogenic compound which can be formed from the reaction of nitrite and dimethylamine that is found in food. Nitrosodimethylamine is activated in liver and alkylates the DNA base and producing a DNA adduct such as O6-methylguanine and N7-methylguanine that have a role in carcinogenesis. In this research, DNA was isolated from rat's blood which was previously given nitrosodimethylamine's precursor, sodium nitrite and dimethylamine. DNA adducts can be obtained from hydrolysis in hydrochloric acid 0.1 N for 30 minutes at 70°C. Then the adducts were analyzed using High Performance Liquid Chromatography (HPLC), with a strong cation exchange column (Supelcosil LC-SCX, 5 µm, 250 x 4.6 mm), mobile phase consisting of ammonium phosphate with a final concentration of 40 mM, pH 3.00, flow rate 1.5 mL/minute, column temperature 30°C and detected at excitation wavelength 286 nm and emission wavelength 366 nm. This method gave an acceptable validation result according to accuracy and precision test results that fulfill the requirement and linear calibration curve with a quantitation limit of 22,5403 ng/mL. Rats were divided into six groups that two groups were given nitrosodimethylamine as positive control, three groups were given precursor, and the other was normal control. Blood samples were collected in 1, 2 and 4 hours after last induced. After giving sodium nitrite 110 mg/kg bw and dimethylamine (1:5) orally for a week, N7-methylguanine and O6-methylguanine had not been detected in rat's blood.

Keywords : dimethylamine, DNA adducts, nitrosodimethylamine, N7-methylguanine, O6-methylguanine, sodium nitrite

ABSTRAK

Nitrosodimetilamin merupakan senyawa karsinogenik yang dapat terbentuk melalui reaksi nitrit dan dimetilamin yang sering ditemukan dalam makanan. Nitrosodimetilamin akan diaktivasi di hati dan mengalkilasi basa DNA sehingga terbentuk adduct DNA seperti O6-metilguanin dan N7-metilguanin yang berperan dalam karsinogenesis. Pada penelitian ini dilakukan pengisolasian DNA dari darah tikus yang diberikan prekursor nitrosodimetilamin yaitu natrium nitrit dan dimetilamin. Adduct DNA dapat diperoleh dari hidrolisis DNA dengan asam klorida pada suhu 70°C, kemudian adduct tersebut dianalisis menggunakan Kromatografi Cair Kinerja Tinggi dengan kolom penukar kation kuat (Supelcosil®)

Corresponding author : yahdiana03@yahoo.com

LC-SCX, 5 μ m, 250 x 4,6 mm), fase gerak amonium fosfat dengan konsentrasi akhir 40 mM, kecepatan alir 1,5 ml/menit, suhu kolom 30°C dan diukur pada panjang gelombang eksitasi 286 nm dan emisi 366 nm. Metode yang digunakan memberikan hasil validasi yang baik berdasarkan hasil uji akurasi dan presisi yang memenuhi persyaratan, kurva kalibrasi yang linear, dan batas kuantitasi 22,5403 ng/mL. Tikus sebanyak 24 ekor dibagi menjadi enam kelompok yaitu dua kelompok diberikan nitrosodimetilamin sebagai kontrol positif, tiga kelompok diberikan prekursor dan satu kelompok adalah kontrol normal. Pengambilan darah dilakukan pada 1, 2 dan 4 jam setelah induksi terakhir. Setelah pemberian natrium nitrit 110 mg/kg bb dan dimetilamin (1:5) selama seminggu, belum terdeteksi adanya O6-metilguanin dan N7-metilguanin dalam darah tikus.

Kata kunci: adduct DNA, dimetilamin, natrium nitrit, nitrosodimetilamin, N7-metilguanin, O6-metilguanin

PENDAHULUAN

WHO memperkirakan setiap tahun, 12 juta orang di seluruh dunia menderita kanker dan 7,6 juta diantaranya meninggal dunia (International Union Against Cancer, 2010). Jika tidak dikendalikan, diperkirakan 26 juta orang akan menderita kanker dan 17 juta meninggal karena kanker pada tahun 2030 (WHO, 2010). Berdasarkan Riset Kesehatan Dasar (Riskesdas) 2008, di Indonesia prevalensi tumor/kanker adalah 4,3 per 1000 penduduk. Kanker merupakan penyebab kematian nomor 7 (5,7%) setelah stroke, tuberkulosis, hipertensi, cedera, perinatal, dan diabetes melitus (Departemen Kesehatan Republik Indonesia, 2010). Dari studi epidemiologis diketahui bahwa peningkatan insiden kanker berhubungan dengan mutasi yang disebabkan oleh senyawa karsinogen dari lingkungan (Smart, 2004) termasuk Senyawa nitrosamin umumnya ditemukan pada makanan yang mengandung nitrat atau nitrit sebagai pengawet seperti pada sayuran atau daging dan pada makanan yang diasapkan (Rostkowska, Zwierz, Rozanski, Moniuszko-Jakoniuk, & Roszczenko, 1998).

Nitrosamin dapat terbentuk secara in vitro (dalam bahan makanan), maupun secara in vivo (dalam tubuh manusia) dan pembentukan secara in vivo lebih berperan dalam menimbulkan gangguan kesehatan. Pembentukan nitrosamine secara in vivo ini dapat terjadi melalui reaksi nitrit atau nitrat dengan amin primer, sekunder, dan tersier dalam kandungan makanan ataupun dalam organ manusia yang tidak terpapar senyawa ini (Rostkowska, Zwierz, Rozanski, Moniuszko-Jakoniuk, & Roszczenko, 1998).

Potensi karsinogen senyawa nitrosamin juga bervariasi dan dapat menginduksi tumor pada beberapa spesies hewan di berbagai tempat (Liteplo, Meek, & Windle, 2002). Beberapa studi pada manusia menemukan hubungan antara kanker lambung serta keabnormalan pada hati akibat pengkonsumsian senyawa nitrosodimetilamin (Liteplo, Meek, & Windle, 2002). Karena berbagai studi yang telah dilakukan, IARC (International Agency for Research on Cancer) menyimpulkan bahwa ambilan nitrat dan nitrit yang dapat menyebabkan nitrosasi secara endogen termasuk grup 2A (mungkin karsino-

gen pada manusia) (International Agency for Research on Cancer, 2006).

Penelitian terdahulu telah ditemukan adduct yang berkaitan dengan proses karsinogenesis. Adduct ini merupakan biomarker kerusakan DNA yang mungkin dapat menyebabkan kanker di kemudian hari. Adduct DNA yang terbentuk dari paparan nitrosodimetilamin diantaranya adalah N7-metilguanin (70% dari semua adduct), O6-metilguanin (7%) dan adduct lain dalam jumlah kecil yang diantaranya adalah N3-metiladenin (3%) dan O4-metilimin (Souliotis, 2002).

Kromatografi cair kinerja tinggi merupakan metode yang sesuai untuk menganalisis komponen-komponen asam nukleat dan derivatnya dalam sampel biologi (Natalia, 2009). Pada penelitian ini, analisis adduct yaitu N7-metilguanin dan O6-metilguanin dilakukan secara Kromatografi Cair Kinerja Tinggi (KCKT) penukaran kuat dengan detektor fluoresensi.

Tujuan penelitian ini untuk memperoleh kondisi optimum untuk analisis N7-metilguanin dan O6-metilguanin menggunakan kromatografi cair kinerja tinggi dengan detector fluoresensi dan melakukan deteksi dan kuantitasi adduct yang terbentuk setelah pemberian natrium nitrit dan dimetilamin berulang pada tikus.

METODE

Alat

Alat – alat yang akan digunakan pada penelitian ini adalah kandang tikus dan perlengkapannya; sonde lambung; timbangan hewan (Mettler-Toledo); keranjang timbangan; sarung tangan; koran; pipet hematokrit; tabung K3EDTA; spuit 2,5 mL dan 1 mL; KCKT yang terdiri dari

kolom (Supelcosil LC-SCX 5 μ m, 250 x 4,6 mm), pompa (Shimadzu LC-10AD vp), oven kolom (TC 1900), detector fluoresensi (Shimadzu RF-10A xl), system controller (Shimadzu SCL-10A vp) dan rekorder (Shimadzu Class-VP); syringe 100 μ L (Hamilton); penyaring eluen 0,45 μ m (Whatman); lemari pendingin (Samsung Cooltech Bio); vortex (Maxi Mix II); termomixer (Eppendorf); alat sentrifugasi (DSC-300 SD); timbangan analitik (AND); pengaduk ultrasonik (Elmasonic); pipet eppendorf 10, 100, 1000 μ L; pH meter (Eutech); sample cup; spatel; magnetic stirrer; blue tip; yellow tip; white tip; penangas air; kapas; tabung conical 15 mL; DNA quantitizer; alat-alat gelas.

Bahan

Bahan-bahan yang digunakan dalam penelitian ini adalah standar Nitrosodimetilamin (Wako Pure Chemicals); dimetilamin (Merck); natrium nitrit (Merck); makanan tikus; eter (Merck); O6-metilguanin (Aldrich); N7-metilguanin (Fluka); guanin (Sigma); adenin (Sigma); metanol HPLC grade (Merck); amonium dihidrogen fosfat (Merck); asam klorida (Merck); Kalium dihidrogenfosfat (Merck); akuabidestilata (Kharisma Utama); tris; amonium klorida; kaliumkarbonat; Na₂EDTA; natrium klorida; sodium dodesil sulfat (SDS); natrium hidroksida; fenol (Merck); kloroform (Merck); hidrokuinon (Merck); proteinase K (Fermentas); etanol absolut (Merck); etanol 70%; akuadestilata.

Hewan Uji

Hewan uji yang digunakan adalah tikus putih dewasa jantan galur Sprague-Daw-

ley dengan bobot 140-200 gram. Hewan uji diperoleh dari Bagian Non-Ruminansia dan satwa Harapan di Fakultas Peternakan Institut Pertanian Bogor.

Cara Kerja

Pembuatan Larutan yang Digunakan untuk Isolasi DNA

Pembuatan Larutan Pelisis, Dapar Saline-EDTA (dapar SE), Tris-EDTA (TE), Larutan Tris-HCl 1 M pH 8, Larutan Sodium Dodesil Sulfat (SDS) 10%, Larutan Fenol-Kloroform (1:1) dilakukan menurut cara yang tertera pada Sambrook, Fritsch, & Maniatis (1989).

Pembuatan Larutan Proteinase K (10 mg/ml)

Sebanyak 540,6 µL Proteinase K dengan konsentrasi 18,5 mg/mL dipipet kemudian dilarutkan dalam dapar TE hingga 1 mL selama 30 menit pada suhu kamar.

Pencarian Kondisi Optimum untuk Analisis O6-metilguanin, N7-metilguanin, Guanin dan Adenin.

Kondisi awal yang digunakan untuk analisis adalah berdasarkan penelitian sebelumnya yaitu dengan menggunakan kolom penukar kation kuat (SupelcosilLC-SCX), temperatur kolom 30°C; fase gerak amonium format-metanol (94:6) dengan konsentrasi akhir amonium format 30 mM; pH 3,95, laju alir 1,2ml/menit dan dengan menggunakan detektor fluoresensi yang diukur padapanjang gelombang eksitasi 300 nm dan panjang gelombang emisi 370 nm (Sari,2008).

Sebanyak 20,0 µL campuran larutan standar O6-metilguanin 0,1 µg/ml, N7-metilguanin 1,5 µg/ml, guanin 1 µg/mL dan adenin 7,5 µg/mL disuntikkan kedalam KCKT dengan menggunakan variasi konsentrasi fase gerak masing-masing

yaitu dengan menggunakan amonium fosfat 40 mM, 50 mM, 60 mM pH 3,00. Kecepatan alir yang digunakan adalah 1,5 mL/menit, suhu kolom 30°C, dan dideteksi pada panjang gelombang eksitasi 286 nm dan emisi 366 nm. Kemudian dicatat waktu retensi (tR), dihitung jumlah lempeng teoritis (N), HETP, dan faktor ikutan (Tf). Komposisi fase gerak yang dipilih ditentukan pada kondisi yang memberikan N yang tinggi, HETP yang rendah dan memiliki resolusi yang baik.

Validasi Metode Analisis

Uji Kesesuaian Sistem

Sebanyak 20,0 µL campuran larutan standar O6-metilguanin 0,1 µg/mL dan N7-metilguanin 1 µg/mL disuntikkan ke dalam KCKT pada kondisi analisis terpilih. Prosedur diulangi sebanyak lima kali. Dari kromatogram yang diperoleh, ditentukan efisiensi kolom (N dan HETP), faktor ikutan dan koefisien variasinya. Sebanyak 20,0 µL campuran larutan standar O6-metilguanin 0,1 µg/ml, N7-metilguanin 1,5 µg/ml, guanin 1 µg/ml, dan adenin 7,5 µg/mL disuntikkan kedalam KCKT pada kondisi analisis terpilih. Prosedur diulangi sebanyak lima kali. Dari kromatogram yang diperoleh, ditentukan resolusinya.

Uji Selektivitas

Sebanyak 20,0 µL larutan standar O6-metilguanin 0,1 µg/ml, N7-metilguanin 1,5 µg/ml, guanin 1 µg/ml, dan adenin 7,5 µg/mL disuntikkan kedalam KCKT pada kondisi analisis terpilih, kemudian dicatat waktu retensi dari masing-masing standar.

Pembuatan Kurva Kalibrasi dan Penentuan Batas Deteksi (LOD) dan Batas Kuantitasi (LOQ)

Sebanyak 20,0 μL campuran larutan standar O6-metilguanin dengan konsentrasi 1; 2; 5; 20; 50; 100; 200; 400, dan 500 ng/mL dan N7-metilguanin dengan konsentrasi 10; 20; 50; 200; 500; 1000; 2000; 4000, dan 5000 ng/mL disuntikkan ke dalam alat KCKT pada kondisi analisis terpilih. Area yang diperoleh kemudian dicatat dan dibuat kurva kalibrasinya, lalu dihitung koefisien korelasinya (r) serta harga LOD dan LOQ.

Uji Ketepatan (Akurasi) dan Keseksamaan (Presisi)

Sebanyak 20,0 μL campuran larutan standar O6-metilguanin dengan konsentrasi 0,18; 0,29; 0,4 $\mu\text{g/mL}$ dan N7-metilguanin dengan konsentrasi 2,6; 3,3; 4 $\mu\text{g/mL}$ disuntikkan ke dalam KCKT pada kondisi analisis terpilih. Prosedur diulangi sebanyak enam kali. Dari area yang diperoleh, dihitung % differensiasi, simpangan baku relatif dan koefisien variasinya. Konsentrasi larutan standar dihitung dengan menggunakan kurva kalibrasi baru yang dibuat pada hari akurasi presisi dilakukan.

Uji Stabilitas

Sebanyak 20 μL campuran larutan standar O6-metilguanin 0,1 $\mu\text{g/mL}$ dan N7-metilguanin 1 $\mu\text{g/mL}$ disuntikkan ke dalam alat KCKT pada kondisi analisis terpilih. Area yang diperoleh dicatat, dihitung simpangan baku relatif dan koefisien variansinya. Simpan larutan dalam lemari pendingin. Prosedur ini diulangi kembali, pada hari ke dua dan ke tiga dengan frekuensi pen-

yuntikan masing-masing tiga kali. Reaksi DNA dengan Nitrosodimetilamin In Vitro

DNA yang diisolasi dari darah ditambahkan 1 mM EDTA. Reaksikan DNA dengan 0,751 mL nitrosodimetilamin dalam dapar tris 0,01 M pH 7,5. Kemudian larutan diinkubasi selama 10 jam pada suhu 37°C. Setelah diinkubasi, endapkan DNA dengan menggunakan 2x volume etanol absolut. Sentrifus pada 3000 rpm selama 10 menit. Pindahkan supernatan ke tabung lain. Hidrolisis endapan dan supernatan dengan larutan HCl 0,1 N pada suhu 70°C selama 30 menit, dan suntikkan aliquot ke KCKT sebanyak 20 μL . 3.5.7 Reaksi Guanin dengan Nitrosodimetilamin In Vitro Guanin sebanyak 5 mg dilarutkan dalam 2 mL larutan kalium dihidrogen fosfat 5 mM dengan larutan nitrosodimetilamin 0,751 mL dalam dapar Tris 0,01 M pH 7,5, dan diinkubasi pada suhu 37°C selama 6 jam. Guanin yang teralkilasi diendapkan dengan menggunakan larutan etanol absolut, disentrifugasi dengan kecepatan 3.000 putaran per menit selama 10 menit, dicuci kembali endapan guanin teralkilasi dengan menggunakan larutan etanol 70%, dan disentrifugasi kembali. Endapan guanin dan supernatan dihidrolisis dengan menggunakan 1 mL larutan asam klorida 0,1 N pada suhu 70°C selama 30 menit. Hasil hidrolisis guanin dan supernatan disuntikkan sebanyak 20 μL ke KCKT pada kondisi analisis terpilih.

Perlakuan terhadap Hewan Uji

Orientasi Penentuan Dosis NaNO_2 untuk Pembentukan Adduct DNA Maksimum pada Tikus

Pada penelitian ini digunakan tikus putih dewasa jantan galur SpragueDawley seba-

gai hewan uji. Hewan uji yang digunakan berasal dari galur serta jenis kelamin yang sama. Umur dan berat badan pun diusahakan sama. Sejumlah tikus digunakan untuk mencari kadar adduct DNA maksimum pada tikus. Pertama dilakukan orientasi dosis NaNO₂ (LD₅₀ = 220 mg/kg BB) dengan menggunakan 6 kelompok tikus jantan masing-masing kelompok terdiri dari 3 ekor dengan perlakuan sebagai berikut :

Tabel 1. Perlakuan untuk orientasi dosis NaNO₂

Kelompok	Perlakuan	Jumlah hewan uji (Ekor)
I	Hewan uji diberi larutan air mengandung natrium nitrit dengan dosis 0,25xLD ₅₀	3
II	Hewan uji diberi larutan air mengandung natrium nitrit dengan dosis 0,5xLD ₅₀	3
III	Hewan uji diberi larutan air mengandung natrium nitrit dengan dosis 0,5xLD ₅₀	3
IV	Hewan uji diberi larutan air mengandung natrium nitrit dengan dosis 0,25xLD ₅₀ dan dimetilamin(1:5)	3
V	Hewan uji diberi larutan air mengandung natrium nitrit dengan dosis 0,5xLD ₅₀ dan dimetilamin(1:5)	3
VI	Hewan uji diberi larutan air mengandung natrium nitrit dengan dosis 0,5xLD ₅₀ dan dimetilamin(1:5)	3

Perlakuan untuk orientasi dosis dilakukan setiap hari selama seminggu. Setelah perlakuan selama seminggu, 4 jam setelah pemberian terakhir, darah tikus sebanyak 3 ml, diisolasi DNANYa, kemudian hasil isolasi DNA disuntikkan ke KCKT pada kondisi analisis terpilih.

Persiapan Hewan Uji

Jumlah hewan yang digunakan dalam percobaan adalah 4 ekor untuk setiap kelompok yang dihitung berdasarkan rumus Federer. Pada penelitian ini dengan enam perlakuan diperlukan jumlah tikus mini-

mal adalah 4 ekor untuk setiap kelompok. Sebelum diberi perlakuan seluruh hewan diaklimatisasi terlebih dahulu selama dua minggu. Selama aklimatisasi dilakukan pengamatan berupa kesehatan dan keadaan umum terhadap hewan uji.

Pemberian Perlakuan

Setelah diaklimatisasi dan dikelompokkan secara Rancangan Acak Lengkap, percobaan dilakukan untuk melihat waktu maksimum terbentuknya adduct DNA.

Tabel 2. Kelompok Perlakuan Uji

Kelompok	Perlakuan	Jumlah hewan uji (Ekor)
I (Kontrol positif)	Hewan uji diberi larutan air mengandung nitrosodimetilamin dan pengambilan darah dilakukan pada waktu 1 jam setelah pemberian terakhir	4
II (Kontrol positif)	Hewan uji diberi larutan air mengandung nitrosodimetilamin dan pengambilan darah dilakukan pada waktu 2 jam setelah pemberian terakhir	4
III (kelompok uji)	Hewan uji diberi larutan air mengandung natrium nitrit dan dime-tilamin dosis terpilih dan pengam-bilan darah dilakukan pada waktu 1 jam setelah pemberian terakhir	4
IV (kelompok uji)	Hewan uji diberi larutan air meng-andung natrium nitrit dan dime-tilamin dosis terpilih dan pengam-bilan darah dilakukan pada waktu 2 jam setelah pemberian terakhir	4
V (kelompok uji)	Hewan uji diberi larutan air meng-andung natrium nitrit dan dime-tilamin dosis terpilih dan pengam-bilan darah dilakukan pada waktu 4 jam setelah pemberian terakhir	4
VI (Kontrol negatif)	Hewan uji diberi air suling 4	4

Cara Pengambilan Darah Tikus

Setelah waktu yang telah ditentukan, tikus terlebih dahulu dianestesi secara inhalasi dengan eter. Darah tikus diambil dari sinus orbital mata dengan menggunakan pipet hematokrit. Sebanyak 3 mL darah diambil, dimasukkan dalam tabung K3EDTA, kemudian dilakukan pengisolasian DNA dalam darah dengan menggunakan prosedur isolasi DNA seperti yang tertera pada prosedur berikut

Prosedur Isolasi DNA (National Institutes of Health, 2004)

Sebanyak 3 mL darah ditambahkan dengan 7 mL larutan pelisis (lysingsolution). Kemudian larutan disentrifugasi pada 3.000 rpm, selama 10 menit pada suhu 4oC. Supernatan yang diperoleh dibuang dan pelet yang dihasilkan ditambahkan dengan 2 mL dapar SE, ditambahkan 20 µL proteinase K (10 mg/ml) dan 100 µL larutan SDS 10%. Kemudian larutan diinkubasi pada suhu 37oC selama 60

menit, dan setelah diinkubasi, ditambahkan dengan fenol : kloroform (1:1) sebanyak satu kali volume larutan, kemudian dikocok selama 15 menit. Lalularutan disentrifugasi pada 2.500 rpm, selama 20 menit pada suhu 20°C.

Supernatan dari larutan diambil, kemudian dipindahkan ke dalam tabung baru. Pada larutan tersebut ditambahkan etanol absolut sebanyak dua kali volume larutan, kemudian larutan disentrifugasi pada 12.000 rpm, selama 10 menit pada 4°C. Pelet yang dihasilkan diambil dan dicuci dengan etanol 70% sebanyak satu kali volume, dan disentrifugasi pada 12.000 rpm selama 5 menit. Pelet yang dihasilkan dicuci kembali dengan etanol 70% sebanyak satu kali volume dan disentrifugasi pada 12.000 rpm selama 5 menit. Pelet yang diperoleh dilarutkan dalam akuades dan disimpan dalam freezer (suhu -20°C) sampai waktu akandianalisis.

Penentuan Waktu Retensi DNA (tanpa hidrolisis)

DNA yang diperoleh dari hasil isolasi disuntikkan sebanyak 20 µL kedalam KCKT pada kondisi analisis terpilih, dan dicatat waktu retensi basa DNA.

Penentuan Waktu Retensi DNA (dengan hidrolisis)

DNA yang diperoleh dari hasil isolasi dihidrolisis dengan menggunakan 100,0 µL larutan asam klorida 0,1 N pada suhu 70°C selama 30 menit. Hasil dari hidrolisis kemudian disuntikkan sebanyak 20 µL ke dalam KCKT pada kondisi analisis terpilih dan dicatat waktu retensi basa DNA. Dari area yang diperoleh, konsentrasi adduct dapat dihitung dengan menggunakan

kurva kalibrasi standar.

HASIL DAN PEMBAHASAN

Pencarian kondisi optimum untuk analisis N7-metilguanin dan O6-metilguanin

Analisis N7-metilguanin dan O6-metilguanin dilakukan dengan menggunakan metode kromatografi cair kinerja tinggi (KCKT) penukar kation kuat (strong cation exchange/SCX) dan detektor fluoresensi. Adapun alasan digunakan KCKT karena metode ini cukup sederhana, dan dapat mendeteksi adduct dalam kadar yang rendah, penyiapan sampel sederhana, hasil pemisahan baik, detektor sensitif dengan kolom yang selektif, kolom dapat digunakan kembali serta ideal untuk molekul besar dan ion (Johnson & Stevenson, 1991).

Konsentrasi amonium fosfat yang digunakan adalah 0,04 M, pH 3,00, kecepatan alir 1,5 mL/menit, suhu kolom 30°C, dan dilengkapi dengan detektor fluoresensi pada panjang gelombang eksitasi 286 nm dan emisi 366 nm. Keseluruhan metode yang digunakan adalah metode baru yang dikembangkan melalui modifikasi berdasarkan literatur yang diperoleh (Herron & Shank, 1979) dengan menggunakan dapar amonium fosfat.

Pemisahan adduct DNA ini dapat dilakukan dengan menggunakan kolom penukar kation kuat, fase gerak daparamonium fosfat 50 mM dan pH 2,00 (Herron & Shank, 1979). Modifikasi dilakukan pada konsentrasi fase gerak dan pH dikarenakan kolom penukar kation kuat sebaiknya digunakan dalam rentang pH 3,00 hingga 7,00 dan penggunaan dapar amonium fosfat dengan konsentrasi 40 mM pH 3,00 memiliki resolusi yang lebih baik, serta nilai N yang lebih tinggi dan HETP yang

lebih rendah

Untuk mencari kondisi analisis yang optimum, campuran larutan standar N7-metilguanin dan O6-metilguanin dengan konsentrasi 1 µg/mL dan 100,0 ng/mL disuntikkan ke dalam KCKT. Berdasarkan kromatogram yang diperoleh, dapat dihitung jumlah lempeng teoritis (N) dan HETP yang menunjukkan efisiensi kolom. Keadaan kromatografi yang ideal memiliki N yang lebih besar dari 2500 dan HETP yang rendah.

Validasi Metode Analisis

Uji Kesesuaian Sistem (Farmakope Indonesia edisi keempat, 1995)

Uji kesesuaian sistem dilakukan untuk mengetahui apakah metode yang akan digunakan dapat dipakai untuk menganalisis komponen yang akan dipisahkan. berdasar pada parameter efisiensi kolom (pelat teoritis (N) dan HETP), faktor ikutan, koefisien variasi dan resolusi. Uji resolusi dilakukan dengan menggunakan campuran larutan standar guanin, adenin, N7-metilguanin dan O6-metilguanin dengan konsentrasi masing-masing 1,03; 7,5; 1,5; dan 0,1 µg/mL. Metode analisis yang digunakan memberikan jumlah pelat teoritis di atas 2500 dan keterulangan di bawah 2% serta memisahkan komponen-komponen campuran dengan hasil resolusi di atas 1,5. Hal ini menunjukkan bahwa metode dapat digunakan untuk menganalisis komponen-komponen dalam sampel.

Uji Selektivitas

Uji selektivitas dilakukan untuk mengetahui adanya gangguan oleh komponen lain. Standar yang digunakan yaitu guanin, adenin, N7-metilguanin dan O6-metilgua-

in dengan waktu retensi berturut-turut yaitu 4,175; 5,567; 6,367 dan 12,608 menit. Kromatogram yang diperoleh menunjukkan bahwa metode yang digunakan cukup selektif untuk mendeteksi N7-metilguanin dan O6-metilguanin dalam sampel, dengan nilai resolusi di atas 1,5 dan pada waktu retensi zat tidak terdapat gangguan lain.

Pembuatan Kurva Kalibrasi dan Uji Linearitas

Konsentrasi N7-metilguanin yang digunakan pada data kurva kalibrasi adalah 10,3; 20,6; 51,5; 206; 515; 1030; 2060; 4120; dan 5150 ng/mL, sedangkan konsentrasi O6-metilguanin yang digunakan adalah 1,002; 2,004; 5,01; 20,04; 50,1; 100,2; 200,4; 400,8; dan 501,0 ng/mL. Kurva kalibrasi N7-metilguanin yang diperoleh memiliki persamaan garis $y = 215,8614x - 2.044,38$ dengan harga koefisien korelasi (r) sebesar 0,9999, dan kurva kalibrasi O6-metilguanin yang diperoleh memiliki persamaan garis $y = 7877,376x - 1034,14$ dengan harga koefisien korelasi (r) sebesar 0,9999. Koefisien korelasi yang diperoleh lebih besar dari 0,999.

Selain koefisien korelasi, parameter yang digunakan untuk mengetahui linearitas kurva kalibrasi yang diperoleh adalah koefisien fungsi regresi (V_{x0}). Koefisien fungsi regresi yang diperoleh dari kurva kalibrasi N7-metilguanin adalah 1,58%, dan O6-metilguanin adalah 1,99%. Hal ini menunjukkan bahwa pada konsentrasi yang digunakan diperoleh linearitas yang cukup baik.

Penentuan Batas Deteksi (LOD) dan Batas Kuantitasi (LOQ)

Uji batas deteksi (LOD) dan uji batas kuantitasi (LOQ) untuk N7-metilguanin dan O6-metilguanin yang diperoleh dari hasil validasi relatif cukup rendah yaitu LOD sebesar 69,0071 ng/mL dan LOQ sebesar 230,0237 ng/mL untuk N7-metilguanin, sedangkan O6-metilguanin mempunyai LOD sebesar 6,7621 ng/mL dan LOQ sebesar 22,5403 ng/mL

Uji Ketepatan (Akurasi) dan Keseksamaan (Presisi)

Semua data uji akurasi yang diperoleh memberikan nilai %diff yang berada dalam rentang -2 sampai 2%. Untuk uji presisi, konsentrasi yang digunakan adalah 2,678; 3,399; dan 4,120 µg/ml, sedangkan untuk O6-metilguanin yaitu 0,186; 0,300; dan 0,414 µg/mL. Data uji presisi untuk N7-metilguanin dengan konsentrasi sebesar 2,678; 3,399; dan 4,120 µg/mL memberikan harga koefisien variasi berturut-turut yakni 0,72 ; 0,57; dan 0,42%, sedangkan data uji presisi untuk O6-metilguanin dengan konsentrasi sebesar 0,186; 0,300; dan 0,414 µg/mL memberikan harga koefisien variasi berturut-turut yakni 0,64 ; 1,02; dan 1,09%

Uji Stabilitas

Uji stabilitas N7-metilguanin dan O6-metilguanin selama 3 hari berturut-turut dengan konsentrasi 1,03 dan 0,1 µg/mL memberikan harga koefisien variasi sebesar 1,74% dan 1,94%. Hal ini menunjukkan bahwa larutan standar bersifat relatif stabil. Uji stabilitas sebenarnya dilakukan juga pada hari ke-9, namun koefisien variasi yang diperoleh sudah melebihi 2%.

Berdasarkan data-data validasi yang diperoleh, dapat dirangkum bahwa metode yang digunakan memiliki linearitas yang baik dengan koefisien korelasi yang mendekati 1, batas deteksi dan batas kuantitasi yang rendah sehingga dapat menganalisis zat dalam kadar rendah, serta memiliki nilai akurasi dan presisi yang baik yang dilihat dari parameter % diff yang berada dalam rentang -2 sampai 2% dan koefisien variasi di bawah 2%.

Reaksi DNA dengan Nitrosodimetilamin In Vitro

Tujuan dilakukan verifikasi reaksi antara DNA yang diisolasi dari darah tikus adalah untuk meyakinkan bahwa reaksi antara nitrosodimetilamin dan DNA terjadi, agar hasil yang diperoleh dari simulasi in vitro dapat mendekati dan merefleksikan yang terjadi secara in vivo. DNA hasil isolasi dilarutkan dalam aquades sebanyak 0,3 mL. Kemudian dilakukan kuantitasi DNA dan diperoleh konsentrasi DNA sebesar 657,5 µg/mL.

Penambahan EDTA dilakukan untuk mencegah nuklease yang dapat mendegradasi DNA. Jumlah nitrosodimetilamin yang ditambahkan berdasarkan LD50 pada tikus yaitu 40 mg/kg (Liteplo, Meek, & Windle, 2002) Nitrosodimetilamin dilarutkan dalam dapar tris-HCl 0,01 M pH 7,5 hingga mencapai konsentrasi 10,66 mg/mL. DNA hasil isolasi kemudian direaksikan dengan 0,751 mL nitrosodimetilamin dengan konsentrasi 10,66 mg/ml, lalu diinkubasi pada suhu 37°C.

Reaksi antara DNA hasil isolasi dengan nitrosodimetilamin setelah diinkubasi selama 10 jam pada suhu 37°C yang dihidrolisis dengan asam klorida 0,1 N selama

30 menit pada suhu 70°C menghasilkan adduct O6-metilguanin pada waktu retensi 13,208 menit. Awalnya waktu inkubasi dilakukan selama 6 jam, tetapi tidak ditemukan adduct O6-metilguanin maupun N7-metilguanin. Tidak ditemukan adduct ini mungkin dikarenakan reaksi ini berlangsung tanpa enzim yang dapat mengubah nitrosodimetilamin menjadi bentuk aktif yang mengalkilasi DNA. Reaksi kemudian diperlama waktu inkubasinya menjadi 10 jam, dengan harapan nitrosodimetilamin dapat terhidrolisis menjadi bentuk aktif dengan waktu inkubasi yang lebih lama. Dengan waktu inkubasi yang lebih lama, ditemukan adanya adduct O6-metilguanin dengan konsentrasi 22,295 ng/mL.

Untuk memastikan jenis adduct hasil reaksi, maka dilakukan metode spiking, untuk memperkuat bahwa adduct hasil reaksi adalah N7-metilguanin atau O6-metilguanin. Kromatogram yang diperoleh setelah metode spiking mengalami penambahan area yaitu dari 174591 $\mu\text{v/s}$ menjadi 484299 $\mu\text{v/s}$, namun dengan waktu retensi yang lebih awal. Hal ini mungkin dapat dikarenakan adduct tersebut merupakan hasil reaksi, sehingga sulit untuk memperoleh hasil yang benar-benar sama.

Reaksi Guanin dengan Nitrosodimetilamin In Vitro

Pada penelitian ini juga dilakukan reaksi antara guanin dengan nitrosodimetilamin secara in vitro. Guanin merupakan salah satu komponen basa DNA. Reaksi guanin dengan nitrosodimetilamin dilakukan untuk memperkuat reaksi DNA dengan nitrosodimetilamin secara in vitro. Gua-

nin sebanyak 5 mg dilarutkan dalam 2 mL kalium dihidrogen fosfat, lalu direaksikan dengan 0,751 mL nitrosodimetilamin, kemudian diinkubasi selama 6 jam. Reaksi antara guanin dengan nitrosodimetilamin setelah diinkubasi selama 6 jam pada suhu 37°C yang dihidrolisis dengan asam klorida 0,1 N selama 30 menit pada suhu 70°C menghasilkan adduct N7-metilguanin pada waktu retensi 6,525 menit dengan konsentrasi 44,09 ng/mL. Pada reaksi ini juga dilakukan metode spiking, dan diperoleh kromatogram dengan adduct N7-metilguanin yang mengalami pertambahan area yaitu dari 7473 $\mu\text{v/s}$ menjadi 14857 $\mu\text{v/s}$ dengan waktu retensi yang sama.

Perlakuan terhadap Hewan Uji

Pemberian Perlakuan pada Hewan Uji

Setelah diaklimatisasi, hewan uji (tikus) kemudian dipilih yang sehat dan dikelompokkan secara acak menjadi 6 kelompok. Masing-masing kelompok terdiri dari 4 ekor tikus berdasarkan perhitungan dari rumus Federer. Pemberian prekursor yaitu natrium nitrit dan dimetilamin diberikan peroral selama 1 minggu. Nitrosodimetilamin diberikandengan dosis 100 $\mu\text{g/kg}$ bb yang mengacu pada penelitian sebelumnya di mana dengan dosis tersebut sistem perbaikan DNA teralkilasi mengikuti fase lambat yaitu 24,8 jam (Souliotis, et al., 1995).

DNA diisolasi dari darah tikus (whole blood) yang diambil melalui sinus orbital mata tikus. Sampel darah dimasukkan ke dalam tabung K3EDTA. Setelah sampel darah diperoleh, selanjutnya dilakukan isolasi DNA dari darah melalui beberapa tahap. DNA terdapat dalam sel

yang berinti, dan sel yang berinti di dalam komponen darah adalah sel darah putih. DNA yang diperoleh dihidrolisis dengan larutan asam klorida 0,1 N pada suhu 70°C selama 30 menit.

Hasil hidrolisis disuntikkan ke dalam KCKT pada kondisi analisis terpilih, Dari keseluruhan DNA yang diisolasi, terdapat satu kali DNA gagal diisolasi yaitu pada pemberian 0,5 kali LD50 NaNO₂ dan dimetilamin dengan waktu pengambilan darah pada t = 2 jam. Mutasi yang terjadi merupakan awal proses karsinogenesis, sehingga pendeteksian terjadinya mutasi merupakan deteksi awal terjadinya kanker. Proses perbaikan DNA yang teralkilasi dapat dilakukan dengan cara transfer langsung grup alkil dari DNA ke protein repair, yang menyebabkan kehilangan fungsi dari protein, sehingga basa termodifikasi akan terlepas dengan glikosilase meninggalkan site apurinic atau apirimidinic. Strand DNA kemudiandipotong dan dihilangkan oleh endonuklease dan meninggalkan strand utuh sebagai template DNA baru, setelah itu akan diligase untuk melengkapi proses perbaikan (Saffhill, Margison & O'Connor, 1985).

Untuk perbaikan adduct O6-metilguanin, diperkirakan dapat dilakukan oleh enzim O6-alkilguanin DNA-alkiltransferase (AGT) yang secara alami bekerja secara aktif sehingga dapat memindahkan gugus alkil seperti metil dari O6-metilguanin ke residu sistein. Enzim AGT merupakan enzim yang melepaskan adduct O6-metilguanin secara ireversibel, sehingga paparan senyawa karsinogen yang tinggi dapat menurunkan aktivitas enzim perbaikan dengan menghabiskan penyimpanan enzim perbaikan (Reh, 2000). Sedangkan N7-metilguanin merupakan adduct yang

bersifat kurang stabil, di mana dalam bentuk untai ganda DNA mempunyai t_{1/2} 2 – 150 jam dengan cara kehilangan C8 proton, depurinasi hidrolisis ikatan N-alkyl (Boysen, Pachkowski, Nakamura & Swenberg, 2009).

Nitrosodimetilamin merupakan salah satu senyawa hepatokarsinogen, sehingga pengisolasian DNA dari hati dapat dilakukan untuk memperoleh adduct. Adanya aktivitas hepatokarsinogen ini adalah dikarenakan hati merupakan tempat metabolisme senyawa nitrosodimetilamin menjadi senyawa aktif yang mengalkilasi DNA. Hati merupakan tempat yang sering diinduksi tumor oleh senyawa karsinogenik baik secara langsung maupun tidak langsung yang dapat menyebabkan proliferasi selular sebagai karakterisasi sirosis oleh promoter senyawa karsinogenik (Glenn, 1998). Penelitian yang telah dilakukan oleh Vassilis L. Souliotis, dkk (1995). menunjukkan bahwa kadar adduct DNA yang terbentuk di hati lebih banyak dari pada di darah (Souliotis, 2002). Selain itu, pengisolasian DNA dari hati akan memperoleh DNA yang lebih banyak daripada pengisolasian dari darah sehingga kemungkinan terdeteksi adanya adduct akan lebih besar.

KESIMPULAN

Kondisi optimum untuk analisis N7-metilguanin dan O6-metilguanin yang digunakan dalam penelitian ini adalah Kromatografi Cair Kinerja Tinggi (KCKT) dengan kolom penukar kation kuat Supelcosil LC-SCX (5 µm, 250 x 4,6 mm), fase gerak amonium fosfat dengan konsentrasi akhir amonium fosfat 40 mM, pH 3,00, kecepatan alir 1,5 mL/menit, suhu kolom 30°C,

dan detektor fluoresensi pada panjang gelombang eksitasi 286 nm dan emisi 366 nm. Tidak terdeteksi adanya N7-metilguanin dan O6-metilguanin dalam darah tikus selama diberikan natrium nitrit dan dime-tilamin per oral dengan dosis 110 mg/kg untuk natrium nitrit dan dimetilamin (1:5) selama pemberian satu minggu dengan kondisi analisis optimal, tetapi verifikasi secara in vitro menunjukkan adanya adduct O6-metilguanin pada waktu retensi 13,208 menit.

DAFTAR ACUAN

- Boysen G, et al. 2009. *The formation and biological significance of N7-guanine adducts*. Mutation Research , 678: 76-94.
- Departemen Kesehatan Republik Indonesia. 2010. *Jika tidak dikendalikan 26 juta orang di dunia menderita kanker*. 5 Mei 2010. <http://www.depkes.go.id/index.php/component/content/article/43-newsslider/1060-jika-tidak-dikendalikan-26-juta-orang-di-dunia-menderitakanker.html>
- Herron DC, Shank R. 1979. *Quantitative high-pressure liquid chromatographic analysis of methylated purines in DNA of rats treated with chemical carcinogens*. Analytical Biochemistry , 100: 58-63.
- International agency for research on cancer. 2006. *Ingested nitrates and nitrites volume 94*. 9 November 2009.
- International Union Against Cancer. 2010. *Cancer can be prevented too*. 5 Mei 2010.
- Johnson EC, Stevenson R. 1991. *Dasar Kromatografi Cair*. Bandung: Penerbit ITB.
- Liteplo R, Meek M, Windle W. 2002. N-Nitrosodimethylamine. *Concise International Chemical Assessment Document* 38. Genewa.
- National Institutes of Health. 2004. *DNA preparation from blood*. 2 Januari 2010.
- Reh BD. 2000. *O6-Methylguanine DNA adducts associated with occupational nitrosamine exposure*. Carcinogenesis , 21: 29-33.
- Rostkowska K, Zwierz K, Rozanski A, Moniuszko-Jakoniuk J, Roszczenko A. 1998. *Formation and metabolism of N-Nitrosamines*. Polish Journal of Environmental Studies , 7: 321-325.
- Saffhill R, Margison G, O'Connor P. 1985. *Mechanisms of carcinogenesis induced by alkylating agent*. Biochimica et Biophysica Acta , 823: 111-145.
- Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T. 1989. *Molecular cloning, a laboratory manual* (edisi kedua, Vol. 3). New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- Sari N. 2008. *Analisis O6-alkilguanin dalam darah tikus selama pemberian berulang siklofosfamid per oral*. Skripsi Program S1 Farmasi UI. Depok, 1- 113
- carcinogenesis. Dalam E. Hodgson, *A textbook of Modern Toxicology*, 3: 225 - 250.
- Souliotis VL, et al. 1995. *Dosimetry of O6-methylguanine in rat DNA after low-dose, chronic exposure N-nitrosodimethylamine (NDMA)*. Carcinogenesis, 16: 2381-2387.
- World Health Organization. 2008. *N-Nitrosodimethylamine in drinking-water*. 24 April 2010 http://www.who.int/water_sanitation_health/dwq/chemicals/ndma_2add_feb2008.pdf

