

PEMANFAATAN TEKNIK *PREMATURE CHROMOSOME CONDENSATION* DAN UJI MIKRONUKLEI DALAM DOSIMETRI BIOLOGI

Mukh Syaifudin

Pusat Teknologi Keselamatan dan Metrologi Radiasi - BATAN

ABSTRAK

PEMANFAATAN TEKNIK *PREMATURE CHROMOSOME CONDENSATION* DAN UJI MIKRONUKLEI DALAM DOSIMETRI BIOLOGI. Radiasi dapat menyebabkan berbagai macam kerusakan pada kromosom yang mengakibatkan perubahan genetik yang bersifat stabil. Dalam mendeteksi perubahan tersebut ditemui permasalahan yang sulit sehingga dikembangkan beberapa teknik dan uji menggunakan sel limfosit darah perifer sebagai petunjuk seluler. Salah satu teknik sitogenetik tersebut adalah *premature chromosome condensation* (PCC) yang dapat diinduksi dengan penggabungan sel atau secara kimia. Metode ini menarik dan tidak memerlukan metafase dalam memvisualisasi bahan genomik sel. Karena metode ini tidak tergantung pada siklus sel, kromosom dapat dikondensasi dan divisualisasi pada setiap tahap dalam siklus sel. Oleh karena itu sensitivitas dan batas deteksi dalam pengkajian dosis radiasi dengan metode PCC ini lebih tinggi daripada teknik sitogenetik yang lain khususnya untuk dosimetri biologi pada korban yang terkena pajanan radiasi dosis tinggi. Di lain pihak, uji mikronuklei dapat digunakan dalam memperkirakan besarnya pajanan radiasi, tetapi karena bersifat tidak stabil dengan waktu setelah pemajanan maka bukan merupakan dosimetri biologi yang baik untuk beberapa bulan setelah pajanan atau untuk pengkajian pajanan kronik dan berulang. Pencacahan sejumlah sel secara cepat untuk mendapatkan perkiraan dosis yang akurat tetap menjadi kendala yang sulit dan hal ini dapat diatasi dengan mikronuklei. Kesederhanaan, kecepatan dan potensi untuk diotomatisasi adalah kelebihan dari uji ini diantara sekian banyak uji lain yang secara rutin digunakan. Teknik PCC dan uji mikronuklei ini dibahas secara mendetail dalam tinjauan ulang ini.

Kata kunci: teknik premature chromosome condensation, mikronuklei, dosimetri biologi

ABSTRACT

THE UTILIZATION OF *PREMATURE CHROMOSOME CONDENSATION* TECHNIQUE AND MICRONUCLEI ASSAY IN BIOLOGICAL DOSIMETRY.

Radiation could induce a wide variety of chromosomal lesions which may results in stable genetic alterations. In the detection of these alterations some difficult problems were found so that several techniques are developed by using peripheral blood lymphocytes as cellular surrogates. One of some techniques developed is *premature chromosome condensation* (PCC) that can be induced by fusion or chemical addition. This method is attractive and not needs metaphases to visualize the genomic material of the cells. Because the method is independent of the cell cycle, chromosomes can be condensed and visualized in any phase of the cell cycle; therefore, the sensitivity and the upper limit of radiation dose assessment with this method is higher than other cytogenetic techniques especially for biological dosimetry of highly irradiated individuals. On the other hand, micronuclei assay produces a reliable estimation of dose of radiation exposure, but it is unstable with time after exposure and thus not useful for biological dosimetry more than a few months after exposure or for assessing chronic or multiple exposures. Scoring sufficient cells in a short time to enable accurate dose estimation is still a difficult task and this can be accomplished with micronuclei. Simplicity, rapidity and potential for automation are advantages of this assay

over other routinely used assays. Both PCC techniques and micronuclei assay are discussed in detail in this review.

Keywords: premature chromosome condensation technique, micronuclei, biological dosimetry

PENDAHULUAN

Radiasi dapat menyebabkan berbagai macam efek pada target yang dikenainya. Untuk organisme hidup, hal ini terjadi terutama pada komponen inti sel yakni kromosom yang mengandung sebagian besar asam deoksiribonukleat (DNA) pembawa informasi genetik yang sangat penting. Efek radiasi pada sel bersifat random. Artinya, jenis dan jumlah radiasi yang sama dapat mengenai sel yang sama beberapa kali namun menghasilkan efek yang berbeda. Pada umumnya semakin besar radiasi mengenai sel maka akan semakin besar kemungkinan efek yang muncul. Jika sejumlah besar sel terkena radiasi maka sel organisme tersebut dapat terluka atau mati. Seluruh makhluk hidup senantiasa terkena pajanan radiasi latar belakang (*background*). Sebagian besar sel memiliki kemampuan untuk memperbaiki beberapa kerusakan akibat radiasi pada tingkat tertentu. Efek dari dosis radiasi yang sama dengan latar belakang tidak mungkin dapat diukur pada satu individu saja sehingga efek tersebut seringkali dinilai pada suatu populasi daripada per-

individu.¹ Ketika sel menyerap radiasi, maka terdapat empat kemungkinan efek pada sel tersebut. Pertama, sel menjadi cukup terluka yang menyebabkan hilangnya fungsi normal dan sel akan mati. Kedua, sel kemungkinan kehilangan kemampuannya untuk bereproduksi. Ketiga, kode genetik (DNA) yang dikandungnya dapat terluka sedemikian sehingga salinan baru akan berubah yang menyebabkan munculnya kanker. Dan yang ke empat, penyerapan radiasi oleh sel tidak menyebabkan efek apapun.² Interaksi ini masih terus dikembangkan dengan meninjau efek yang terjadi pada sel yang tidak terkena pajanan langsung yang disebut "*bystander effects*".

Kecelakaan radiasi dapat terjadi dimana saja, di rumah sakit, industri, laboratorium, atau dalam perjalanan suatu sumber. Karena pajanan radiasi berhubungan dengan risiko kerusakan sel yang akan berdampak pada kesehatan seseorang yang terkena pajanan maka diperlukan suatu petunjuk praktis bagi dokter atau paramedis dalam menangani korban kecelakaan radiasi.

Penanganan medik yang efektif pada kecelakaan yang melibatkan pajanan radiasi akut dan berlebihan diperlukan catatan medik berkesinambungan, melakukan uji efek radiasi yang tepat, dan menentukan dosis yang tercatat pada dosimeter serta menentukan tingkat radioaktivitas dalam rangka memberikan informasi diagnostik guna penentuan dosis untuk pencatatan proteksi personil. Beberapa parameter generik dan pendekatan respon-dini meliputi pengukuran radioaktivitas dan memonitor korban yang terkena pajanan, mengamati dan mencatat tanda-tanda awal (prodromal) dan munculnya eritema, melakukan pencacahan sel darah lengkap terutama hitung jenis sel darah putih, dan uji sitogenetik aberasi kromosom menggunakan uji disentrik sebagai “*gold standard*” dan atau uji translokasi untuk waktu yang lama setelah pajanan untuk menentukan besarnya dosis.³

Dengan terus berkembangnya pemanfaatan teknologi nuklir dalam segala aspek kehidupan manusia, maka dosimetri atau penentuan dosis merupakan hal yang sangat penting dalam proteksi radiologik. Pemonitoran ruang kerja dan dosimetri personil pada dasarnya digunakan untuk mengantisipasi

terjadinya pemajanan berlebihan atau untuk menjadi bukti ketika seseorang melakukan tindakan komplain sehubungan dengan pemajanan radiasi berlebihan yang dialaminya. Pada awalnya hal ini didasari dengan pembatasan dosis yang didukung oleh tidak adanya perubahan yang terjadi pada diri personil melalui pengkajian yang orisinal dengan pemantauan fisik. Akan tetapi tidak satupun hal ini dapat membuktikan keabsahan dan semuanya bisa berjalan ke arah yang salah. Seseorang yang terkena pajanan radiasi dapat saja terjadi saat tanpa adanya monitor dan atau monitor personil menerima dosis ketika tidak digunakan. Dalam situasi demikian maka dosimetri biologi menjadi penting. Dosimetri biologi sebagai salah satu sarana harus ditetapkan sendiri untuk masing-masing laboratorium dalam rangka pengendalian pajanan. Dosimetri ini mempunyai peranan sangat penting ketika terjadi kecelakaan.⁴ Dua diantara sekian banyak jenis dosimetri biologi adalah aberasi kromosom yang dapat ditentukan dengan teknik *premature chromosome condensation* (PCC) dan mikronuklei (MN) yang keduanya akan dibahas dalam makalah ini.

DOSIMETRI BIOLOGI

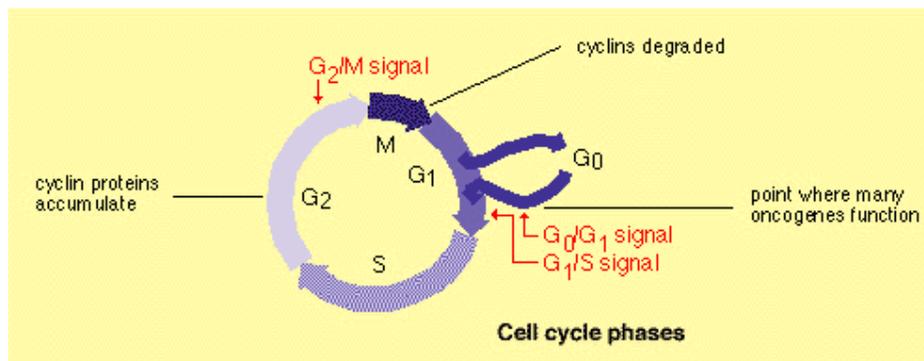
Prinsip dosimetri biologi adalah menentukan dosis (serap) radiasi dengan mengukur perubahan yang terjadi akibat radiasi pada tubuh manusia. Dosimetri ini memiliki sejumlah aplikasi. Salah satu yang paling menonjol adalah dalam kasus kecelakaan radiasi yang tidak disertai dengan dosimetri fisik. Kadangkala metode dosimetri fisik harus dilengkapi atau didukung oleh uji biologik, sebagai contoh terjadinya pajanan sebagian tubuh (parsial) dengan dosimetri fisik diluar area radiasi. Cek silang dosis yang diukur secara fisik memang diperlukan pada kondisi tertentu. Akan tetapi, jika dosis ditentukan secara biologik, variabilitas biologik akan mempengaruhinya, karena diyakini untuk individu yang radiosensitif akan memiliki efek yang lebih besar pada materi biologiknya daripada ukuran rata-rata. Metode fisik sama sekali tidak sesuai untuk maksud ini⁵. Dosis serap merupakan besaran fisik paling penting untuk mengevaluasi potensi respon biologik sebagai akibat pajanan terhadap radiasi pengion. Dosimetri fisik pada umumnya dilakukan dengan menggunakan peralatan yang sensitif terhadap efek fisik dari radiasi pengion. Akan tetapi dalam banyak kasus yang melibatkan pajanan akibat kecelakaan secara nyata

atau terduga, seseorang tersebut tidak menggunakan dosimeter, dan karena itu dosimetri fisik tidak dapat mewakili. Dalam situasi demikian maka studi efek biologik dini yang diinduksi oleh radiasi pengion telah diusulkan baik sebagai pelengkap maupun metode alternatif untuk penentuan dosis.⁶

Untuk materi biologik, sel darah perifer merupakan salah satu diantara berbagai macam materi yang dapat dimanfaatkan dengan sel limfosit menjadi andalan utama karena berbagai kelebihanannya. Materi biologi yang lain yang dapat digunakan meliputi sel *stem* (induk), kuku, gigi, rambut, sperma dan urin. Limfosit manusia adalah sel yang memiliki masa hidup panjang serta mudah diperoleh dari sampel darah. Karena sebagian besar dalam keadaan tidak membelah, maka mereka pada umumnya pada keadaan fase sel G₀ yakni fase sebelum replikasi DNA (Gambar 1). Sel ini dapat distimulasi secara *in vitro* untuk melakukan pembelahan mitotik dengan memberi suatu protein phytohemagglutinin (PHA) dan dapat dihentikan pada metafase pertama dengan menggunakan senyawa colcemid setelah 45 jam dikultur pada 37°C. Slide kemudian dibuat, dikeringkan dan diwarnai dengan Giemsa atau dengan

suatu pelacak (*probe*) *Fluoresence in situ hybridization* (FISH) dan dihitung kelainan dalam sel yang terjadi. Untuk mengetahui ada tidaknya sel yang berasal

dari metafase kedua maka dapat digunakan BrdU yakni pewarnaan fluoresen plus Giemsa (FPG).⁷



Gambar 1. Fase G₀ dari siklus sel yang menunjukkan fase dimana sebagian besar sel limfosit berada pada fase ini.

Dalam penentuan dosis, ditemui beberapa masalah antara lain kemungkinan tingginya dosis radiasi yang menyebabkan berkurangnya jumlah limfosit secara drastis sehingga perkiraan dosisnya kurang tepat. Hal ini dapat diatasi dengan penggunaan teknik *premature chromosome condensation* (PCC). Masalah lain muncul yakni perlunya memperoleh informasi dosis dalam waktu yang dapat diterima. Hal ini selain dapat diatasi dengan teknik PCC, juga dapat diatasi dengan uji mikronuklei (MN) yang keduanya akan dibahas dalam paragraf-paragraf berikut ini. Adalah merupakan hal yang penting untuk Akan tetapi uji ini memerlukan waktu beberapa minggu yang merupakan waktu

menetapkan dosis serap sebelum munculnya tanda-tanda klinis. Hal ini penting untuk menentukan pengobatan dan pengkajian proses kesembuhannya.

PREMATURE CHROMOSOME CONDENSATION (PCC)

Satu tujuan penting dalam penelitian onkologi radiasi adalah pengembangan teknik dan uji atau kombinasi uji untuk perkiraan respon sel tumor dan sel normal terhadap radiasi yakni radiosensitivitas intrinsiknya. Uji ini dapat dilakukan dengan uji koloni yang sangat berhubungan erat dengan keluaran radioterapi.

yang cukup lama bagi pasien kanker. Oleh karena itu perlu dikembangkan

teknik yang digunakan secara rutin dalam klinis. Uji ini juga harus dapat memberikan ukuran langsung atau tidak langsung kematian sel, dimana radiosensitivitas kromosom merupakan satu titik akhir dalam radiosensitivitas intrinsik seluler. Para peneliti kemudian mengembangkan aberasi kromosom metafase dengan teknik konvensional, akan tetapi ditemui kesulitan dalam memperoleh jumlah sel metafase yang cukup karena tertundanya siklus sel atau kematian sel inter-fase setelah radiasi. Permasalahan ini dapat diatasi dengan mempelajari aberasi sel inter-fase secara langsung. Teknik ini disebut PCC yang menggunakan penghambat pospatase. Karena prosedurnya sederhana dan menghasilkan sel dalam keadaan *non cycling*, sehingga unggul untuk menentukan kerusakan kromatin akibat berbagai macam kualitas radiasi karena seseorang dapat mengamati kromatin tanpa adanya efek penundaan siklus sel yang tergantung pada LET dan kematian inter-fase. Teknik PCC juga sangat bermanfaat untuk mengukur patahan kromatid dalam semua fase siklus sel, khususnya fase G2.⁸

Teknik PCC konvensional dilakukan dengan penggabungan (fusi)

sel berinti satu dari darah perifer dengan sel *Chinese Hamster Ovary* (CHO) mitotik dengan bantuan polietilen-glikol (PEG) atau virus Sendai akan menyebabkan terjadinya kondensasi (percepatan) kromosom prematur pada sel interfase. PEG atau virus berfungsi merubah permeabilitas membran sehingga mudah terjadi fusi. Membran inti akan terlarut dengan cepat dan setelah kondensasi kromatin selesai maka 46 kromatid tunggal akan terlihat. Efek radiasi sendiri akan terbentuk sebagai *fragment* dan oleh karena itu bahan kromatid yang melebihi 46 dihitung untuk memperkirakan besarnya kerusakan sitogenetik. Berbeda dengan uji aberasi kromosom atau mikronuklei dalam limfosit, di sini tidak diperlukan stimulasi pembelahan sel untuk mengevaluasi kerusakan sel. Teknik ini mampu menghindari masalah variabilitas stimulasi dan analisisnya jauh lebih cepat. Hasilnya dapat diperoleh dalam 2 jam setelah pengambilan darah.⁹

Selain menggunakan sel CHO yang tekniknya sulit dan rumit serta hasilnya terkadang tidak baik,

maka para peneliti mengembangkan teknik PCC yang distimulasi dengan senyawa kimia. Teknik PCC menggunakan senyawa kimia pertama kali diperkenalkan oleh Kanda R dkk¹⁰ di Jepang yang mengkombinasi induksi kondensasi kromosom prematur dengan asam okadaik atau calyculin A dan penyederhanaan pewarnaan Giemsa. Metode ini mampu mengatasi tiga kendala utama dosimetri biologik konvensional dengan analisis disentrik pada dosis tinggi yakni : a, limfopenia yang disebabkan oleh kematian sel akan menurunkan jumlah limfosit, b, “*arrest*” siklus sel akibat radiasi menyebabkan rendahnya indeks mitotik, dan c, penjujukan hasil disentrik pada dosis tinggi menurunkan presisi perkiraan dosis. Oleh karena itu indeks mitotiknya akan

rendah dan jumlah sel kompeten yang memberikan hasil nyata secara statistik yang didasarkan pada penghitungan paling tidak 100 sel sangat sukar dilakukan pada dosis yang demikian tinggi. PCC yang diinduksi secara kimia secara efisien dapat diperoleh bahkan pada sel yang terkena pajanan hingga 40 Gy.¹¹ Selain dapat digunakan untuk paparan dosis tinggi hingga 40 Gy, teknik ini lebih cepat dan sederhana, dalam waktu 4-6 jam sudah dapat diketahui besarnya dosis. Dengan memfokuskan pada PCC-*ring*, Kanda R¹⁰ mengklaim bahwa hasil PCC berbanding lurus dengan dosis radiasi hingga 20 Gy dan lebih baik daripada disentrik untuk dosis lebih dari 10 Gy. Contoh hasil analisis dengan teknik PCC dengan calyculin A diperlihatkan pada Gambar 2.



Gambar 2. Contoh hasil uji *Premature Chromosome Codensation* (PCC) untuk mendeteksi patahan kromosom (tanda panah). PCC adalah metode yang menghindari *cell-cycle checkpoints*.

Seperti disebutkan di atas bahwa untuk pajanan radiasi dosis tinggi (lebih dari 10 Gy), uji aberasi kromosom tidak sepenuhnya dapat digunakan karena berkurangnya jumlah sel limfosit secara drastis dalam darah sebagai akibat respon fisiologik. Namun tidak demikian halnya dalam penelitian Wojcik A dkk¹² yang mampu menganalisis aberasi kromosom dan mikronuklei (MN) pada pasien kanker yang menerima dosis hingga 100 Gy akibat kecelakaan. Penentuan dosis yang cepat pun menjadi hal yang penting dalam kasus kecelakaan radiasi. Hal ini dapat diatasi dengan teknik PCC.⁸ Dengan PCC, untuk pajanan 40 Gy, sekitar 2% indeks PCC (15% untuk 15 Gy) masih dapat diperoleh untuk analisis sebaran kromosom.

Blakely WF dkk¹³ dari *Armed Forces Radiobiology Research Institute* (AFRRI) di Amerika Serikat juga sedang mengembangkan teknik PCC menggunakan senyawa kimia komersial untuk mengukur aberasi kromosom akibat radiasi pada sel interfase. Metode ini menggunakan suatu senyawa untuk menginduksi PCC dalam limfosit darah perifer manusia yang berada pada fase "istirahat" (G_0). Kemudian *probe* atau pelacak *DNA whole-chromosome* yang

spesifik digunakan dengan teknik FISH untuk mendeteksi sel aberan secara cepat dengan rentang dosis yang luas. Dalam penelitiannya mereka mengembangkan uji *polymerase chain reaction* (PCR) *real-time fluorogenic 5'-nuclease* atau TaqMan untuk mengidentifikasi *bio-marker* molekuler yang responsif terhadap radiasi seperti ekspresi gen sasaran dan mutasi DNA. Tujuannya adalah menetapkan sistem uji yang cepat, tepat dan handal yang dapat digunakan secara praktis pada berbagai skenario pajanan. Metodologi yang memiliki sejumlah aplikasi ini bersama dengan *software* diagnostik saat ini sedang dikembangkan untuk kedaruratan dan kepentingan pembacaan medik.

Teknik PCC telah digunakan oleh Kanda R dkk¹⁰ untuk mengevaluasi dosis yang diterima oleh tiga korban kecelakaan radiasi di Tokaimura Jepang yang melibatkan dosis tinggi radiasi sinar gamma dan neutron (3,0-24,5 Gy). Peneliti tersebut menggunakan bentuk spesifik aberasi kromosom sebagai *PCC-ring* karena frekuensi bentuk cincin ini lebih tinggi akibat pajanan neutron daripada sinar gamma, meskipun bentuk cincin ini bukan merupakan aberasi spesifik untuk neutron. Penelitian intensif

saat ini sedang dikembangkan untuk mengidentifikasi bentuk kromosom spesifik, disertai biomarker molekuler untuk mengatasi keterbatasan ini. Dengan melihat morfologi PCC kita juga bisa mengetahui fase sel. Morfologi PCC menunjukkan fase siklus sel dari sel interfase pada saat penggabungan. Sebagai contoh sel dari fase G1 akan menunjukkan kromatid tunggal per kromosom dan sel dari G2 menunjukkan dua kromatid per kromosom, sedangkan sel dari fase S akan menunjukkan PCC yang hancur/lebur.

Teknik PCC yang dikombinasi dengan teknik FISH juga dapat digunakan untuk mengetahui sensitivitas cell lines terhadap radiasi. Sasai K dkk¹⁴ dari *Department of Radiation Oncology, Stanford University School of Medicine, California, USA*, membuktikan hal ini dengan menggunakan sel fibroblast manusia normal, ataxia-telangiectasia, fibrosarkoma dan melanoma. Sel diiradiasi dengan rentang dosis tertentu kemudian daya tahan hidup sel dan patahan kromosom nomor 4 yang dipulas dengan FISH diuji segera atau 24 jam setelah diiradiasi. Hasilnya menunjukkan bahwa jumlah patahan kromosom sebanding dengan dosis radiasi untuk semua jenis sel yang diuji. Patahan

kromosom juga bertahan hingga 24 jam setelah iradiasi yang menunjukkan radiosensitivitas sel sehingga hubungan antara aberasi kromosom dan daya tahan hidup sel terlihat sama untuk *cell line* yang berbeda. Dengan demikian pencacahan kromosom dengan teknik FISH dan PCC dalam interfase sangat berguna untuk memperkirakan radiosensitivitas sel secara *in situ*.

MIKRONUKLEI

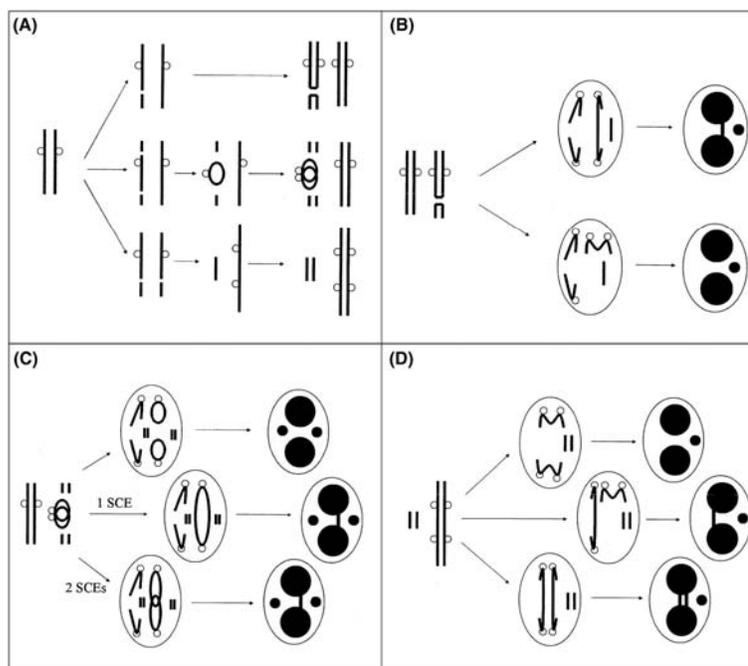
Selain aberasi kromosom yang dapat dideteksi dengan teknik PCC, teknik uji lain yang juga dapat digunakan dalam biosimetri adalah uji mikronukleus yang mana sitokinesis selnya diblok dengan suatu senyawa kimia. Teknik ini dapat untuk mengidentifikasi *fragment* (patahan) atau kadangkala kromosom utuh yang tidak tersegregasi secara benar saat proses mitosis menjadi inti anak. Mikronuklei keluar ke sitoplasma sebagai suatu bentuk kromatin yang diskret yang terlihat berada didekat dua inti anak (binukleat). Keunggulan utama dari uji ini adalah waktu prosesnya dimana mikronuklei dapat dihitung dengan cepat dan sangat sesuai untuk deteksi awal pada sejumlah besar korban kecelakaan radiasi.¹⁵ Teknik pengeblokan yang dimaksudkan untuk memperoleh mikronuklei ini telah diper-

kenalkan lebih dari 30 tahun lalu, tepatnya tahun 1975.⁸ Proses atau mekanisme pembentukan mikronuklei dijelaskan dalam Gambar 3 yang diadopsi (dengan ijin) dari Thomas P. dkk.¹⁶ Jadi MN adalah bentukan kecil di luar inti yang terpisah dari yang utama dan terbentuk selama pembelahan sel oleh kromosom atau fragment kromosom yang terlambat. Karena berhubungan dengan aberasi kromosom, MN telah digunakan sejak tahun 1937 sebagai indikator pajanan genotoksik berdasarkan pada studi radiasi oleh Brenneke dan Mather.¹⁷ Sejak saat itu banyak studi lain dilakukan pada sel tumbuhan, hewan dan manusia, baik secara *in vitro* maupun *in vivo*. Penelitian frekuensi MN juga mendukung asumsi bahwa MN ini merupakan produk awal proses karsinogenik pada manusia.

Uji MN sitokinesis-blok (CB) *in vitro* limfosit darah manusia telah digunakan secara luas untuk pengkajian kerusakan kromosom yang diakibatkan oleh radiasi pengion atau senyawa kimia.¹⁸ MN yang diinduksi radiasi menunjukkan ketergantungannya pada dosis dan kualitas radiasi, dengan demikian MN dapat digunakan sebagai dosimeter biologi untuk maksud proteksi radiasi.¹⁹ Penghitungan MN yang sederhana dibandingkan disentrik dan

kemungkinan untuk menghitung secara otomatis menjadikan tes ini sangat atraktif (menarik) jika sejumlah besar sel harus dihitung yakni untuk skrining rutin para pekerja yang terpajan dosis rendah di ruang kerjanya atau dalam kasus kecelakaan radiasi.²⁰ Skrining orang yang terpajan radiasi dosis rendah lebih jauh memerlukan sensitivitas uji yang tinggi. Untuk maksud ini, terdapat permasalahan mendasar yakni variabilitas yang tinggi diantara frekuensi MN yang terjadi secara spontan.²¹

Pada Gambar 3, proses pembentukan mikronuklei secara mendetail adalah sebagai berikut. (A) Atas, *double-strand DNA break* (DSB) terjadi pada satu kromosom yang tetap ada sampai setelah replikasi. *Misjoining* ujung patahan akan mengarah ke pembentukan kromatid disentrik dan satu fragment asentrik. (Tengah) Dua DSB terbentuk pada kedua sisi sentromer dari satu kromosom. Ujung patahan yang *misrepaired* menghasilkan kromatid cincin dan dua *fragment* asentrik yang selanjutnya direplikasi. (Bawah) DSB terbentuk pada dua kromosom homolog atau non-homolog. *Misjoining* ujung patahan mengarah ke pembentukan kromatid disentrik dan fragment asentrik yang kemudian direplikasi.



Gambar 3. Proses pembentukan awal mikronuklei disertai *nucleoplasmic bridge* (NPB) yang diterangkan secara lebih jelas dalam teks.¹⁶

(B) (Atas) Sentromer dari kromatid disentrik bergerak ke arah kutub yang berlawanan pada anafase membentuk NPB dan *fragment* kromatid asentrik yang tertinggal membentuk MN. (Bawah) Sentromer kromatid disentrik keduanya bergerak ke arah kutub yang sama dan tidak terbentuk NPB, akan tetapi *fragment* kromatid asentrik yang tertinggal membentuk MN.

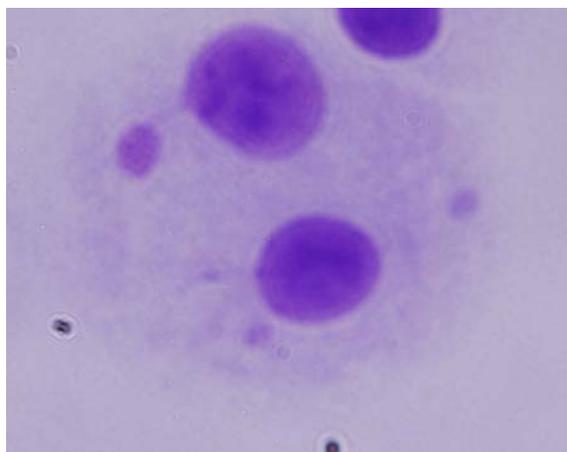
(C) (Atas) Kromatid cincin disegregasi secara normal tetapi *fragment* asentrik gagal pada anafase membentuk MNi. (Tengah) Dua kromatid cincin, setelah selesai satu SCE, ditransformasi ke dalam kromatid cincin disentrik besar

yang mengarah ke pembentukan NPB ketika sentromer bergerak ke arah kutub berlawanan pada anafase. *Fragment* asentrik yang menyertainya gagal pada anafase membentuk dua mikronuklei. (Bawah) Dua kromatid cincin, setelah selesai 2 SCE, berturut-turut mengarah ke pembentukan NPB ketika sentromer bergerak ke arah kutub berlawanan dari sel pada anafase. *Fragment* asentrik yang menyertainya gagal pada anafase membentuk dua MNi. **(D)** (Atas) Sentromer kromatid disentrik bergerak ke arah kutub yang sama dan tidak ada NPB yang terbentuk. (Tengah) Sentromer dari NPB. (Bawah) Sentromer dari kedua

kromatid disentrik bergerak ke kutub berlawanan menyebabkan pembentukan dua NPBs. Pada masing-masing kejadian tersebut satu MN terbentuk dari gagalnya *fragment* kromosom asentrik menyertai kromosom disentrik.¹⁶

Meninjau awal mula MN muncul, telah diketahui dengan baik bahwa sebagian besar MN akibat radiasi terutama berasal dari fragmen kromosom asentrik yang merupakan hasil patahan kromosom. Sejumlah kecil MN akibat radiasi dapat berasal dari kromosom utuh yang gagal (*lag*) setelah anafase disebabkan karena beberapa kelainan pada tingkat spindle atau protein kinetochore. Contoh hasil uji mikronuklei disajikan dalam Gambar 4. Di lain pihak, teknik pengeblokan sitochalasin-B untuk

menginduksi mikronuklei juga menjadi andalan banyak peneliti dalam menentukan dosis radiasi. Mikronuklei dalam sel dua inti terbentuk selama transisi metafase-anafase ketika seluruh kromosom hilang (kejadian aneugenik) atau fragment kromosom asentrik setelah terjadi patahan kromosom (kejadian clastogenik) yang tidak bergabung ke dalam inti sel anak. Karena lebih sederhana, lebih cepat, tidak mahal serta bentuk mikronuklei yang sederhana, mudah dikenali dan ada potensi untuk otomatisasi dengan sitometri maka teknik pengeblokan sitokinesis ini juga diandalkan oleh para peneliti.⁸



Gambar 4. Contoh hasil uji mikronuklei yang diinduksi oleh radiasi sinar gamma dosis 1 Gy. Empat mikronuklei yang berada di samping BNC di dalam sitoplasma.

Kemungkinan pemendekan masa kultur pun telah dibuktikan oleh penelitian Koksal G dkk²² (dari semula 72 jam menjadi 64 jam atau bahkan 56 jam) sehubungan dengan pentingnya waktu antara pengambilan sampel dan perolehan data. Hubungan dosis-respon mikronuklei akan sama atau sedikit lebih rendah daripada disentrik karena tidak semua fragment asentrik berubah menjadi mikronuklei.²³ Sebanyak 1000 sel binukleat biasanya dihitung dan cukup untuk penentuan dosis setelah pewarnaan dengan reaksi Fuelgen, pewarna Giemsa atau fluoresen. Penelitian oleh Lee TK dkk²⁴ mengisyaratkan bahwa mikronuklei dalam limfosit darah perifer dapat dijadikan sebagai biodosimeter untuk pajanan akut dan mungkin juga kronik setelah radiasi *in vivo*. Perbedaan antara pajanan radiasi pengion dengan non radiasi juga dapat diketahui dengan uji mikronuklei menggunakan pelabelan kromosom.²⁵ Namun terdapat variasi yang cukup besar antar-laboratorium atau antar-individu, terutama untuk dosis dengan LET rendah, sehingga masing-masing laboratorium harus merekonstruksi kurva dosis-respon sendiri. Jumlahnya yang menurun dengan waktu dan

sensitivitasnya rendah menyebabkan uji ini perlu dipertimbangkan sebagai dosimetri biologi. Dengan kejadian mikronuklei spontan antara 3-30 per 1000 BNC, uji ini juga menjadi kurang diminati, selain dapat meninggi dengan bertambahnya umur untuk kejadian MN spontan.⁸

Beberapa keunggulan dari uji MN^{8,22} adalah sbb. :

1. Dapat dikombinasi dengan deteksi mutasi kromosom dan genom sekaligus.
2. Dapat membedakan antara klastogen dan aneugen.
3. Ada kemungkinan mendeteksi apoptosis atau nekrosis secara bersamaan.
4. Dapat digunakan untuk banyak jenis sel, cepat, murah, dan sederhana.
5. Ada kemungkinan otomatisasi dan unggul secara statistik.
6. Dapat membedakan antara sel yang sedang membelah dan tidak membelah.
7. Mampu mendeteksi jembatan disentrik (*dicentric bridges*) sebagai jembatan nukleoplasmik dan pengkajian proliferasi sel (persentase sel binukleat).

Akan tetapi uji ini memiliki keterbatasan terutama oleh adanya frekuensi *background* yang lebih besar dan lebih bervariasi dibandingkan dengan disentrik. Uji MN juga tidak mampu mendeteksi semua aberasi kromosom struktural (hanya asentrik), membutuhkan pembelahan sel untuk ekspresi MN, ada kemungkinan interferensi oleh sitochalasin-B seperti *spindle poison*, ada kemungkinan interferensi dengan penghambat lain dari sitokinesis, dan sitotoksitas sitochalasin-B itu sendiri bervariasi antar-jenis sel atau bahkan antar-sub jenis dari jenis sel yang sama.

PEMANFAATAN UJI MIKRONUKLEI DI LAPANGAN

Keandalan uji mikronuklei sebagai dosimeter biologi telah dibuktikan oleh sejumlah laboratorium dalam memantau dosis yang diterima pasien kanker yang menjalani radioterapi. Sampel darah diambil sebelum dan dalam interval waktu tertentu setelah radioterapi (*in vitro*) dan radioterapi itu sendiri sebagai radiasi *in vivo*. Diperoleh hubungan yang linier dari dosis-respon untuk mikronuklei baik *in vivo* maupun *in vitro*. Dosis *in vivo* dapat diketahui dengan mengurangi frekuensi mikronuklei pada kurva iradiasi darah *in*

vitro. Salah satu penelitiannya adalah Le Roux J dkk²⁶ dari *Directorate for Health Technology, Department of Health, Bellville, Afrika Selatan* membuktikan keandalan uji MN ini karena dapat mendekati dan mengoreksi dosis yang diterima pasien pada daerah pelvis dan pulmonary yang telah ditentukan dengan pemeriksaan fisik. Uji ini juga digunakan dalam sejumlah kecelakaan radiasi. Uji ini relatif cepat dan dikategorikan sebagai dosimeter biologi “lini pertama” dalam situasi dimana terjadi pajanan akibat kecelakaan dengan dosis tinggi. Sedangkan Catena C dkk²⁷ dari Italia menguji keandalan uji sitogenetik yang nilainya dapat berubah dengan berjalannya waktu. Teramati adanya kenaikan frekuensi mikronuklei dalam limfosit pasien kanker yang menjalani radioterapi dan setelah iradiasi sinar-X dosis 2 Gy secara *in vitro*. Efek sitogenetik ini diperoleh secara *in vitro* dengan menambahkan dari hasil secara *in vivo*. Mereka menemukan bahwa koefisien k berbanding terbalik dengan frekuensi mikronuklei dan mereka membuktikan bahwa uji mikronuklei dan faktor penyembuhan sitogenetik dapat ditetapkan sebagai cara diagnostik yang cocok digunakan dalam bidang radioterapi.

Livingstone GJ dkk²⁸ di Ohio USA menguji validitas uji mikronucleus sebagai suatu *biomarker* kerusakan kromosom dalam sel mamalia yang aktif membelah. Uji dilakukan untuk mempelajari respon limfosit darah perifer pasien laki-laki berumur 34 tahun setelah pemberian terapi radiasi dengan I-131 dosis ablasi setelah tiroidektomi total. Untuk sampel pertama menunjukkan 35.5 mikronuklei per 1000 sel binukleat. Didasarkan pada persamaan linier dosis-respon dari studi sebelumnya, kenaikan frekuensi mikronuklei sebesar 6 kali menunjukkan bahwa dosis pada darah perifer mendekati 11 cGy dan mendekati 30 cGy jika menggunakan model baru dari data cacah seluruh tubuh eksternal. Meskipun cacah mikronukleus berfluktuasi (4-6 kali di atas *background*), frekuensi setelah 8 bulan mirip dengan sampel pertama. Data juga menunjukkan bahwa kerusakan seluler akibat radiasi tetap ada selama berbulan-bulan. Hasil studi ini mendukung bahwa uji mikronuklus limfosit adalah cepat, sensitif dan mungkin merupakan biomarker kuantitatif pajanan radiasi dosis rendah (< 25 cGy).

Penelitian mikronuklei pada darah perifer yang diperoleh dari berbagai organisme seperti manusia, sapi,

kambing, kelinci, ikan dan ayam telah dilakukan oleh Kim SR dkk²⁹ di Chonnam National University, Korea Selatan. Pengamatan menunjukkan kenaikan frekuensi MN dengan rentang dosis hingga 400 cGy pada semua organisme yang diuji. Darah manusia, sapi, dan kambing lebih sensitif dibandingkan dengan babi dan kelinci. Namun penelitian ini gagal menunjukkan hasil uji MN pada ikan dan ayam. Mereka juga menyatakan bahwa studi radiobiologi *in vitro* menggunakan spesies mamalia tertentu dapat digunakan untuk studi lingkungan. Studi lain yang membandingkan frekuensi MN pada manusia, tikus dan mencit telah dilakukan menggunakan sumber radiasi sinar-X dosis 38, 75, 150 dan 300 cGy. Ada kecenderungan kenaikan persentase MN dengan bertambahnya dosis dan kurva regresi linier-kuadrat hampir sama. Mencit lebih tinggi komponen kuadratnya daripada manusia dan tikus. Meskipun korelasi antara persentase sel dengan MN dan aberasi kromosomnya tinggi (r^2 lebih dari 0,95), darah mencit dan tikus dua kali lebih efisien dalam membentuk MN.³⁰

Joksic G. dkk³¹ dari *Institute of Nuclear Sciences, Medical Protection Center*, Beograd, Yugoslavia mengguna-

kan uji MN dan analisis aberasi kromosom untuk perkiraan variabilitas respon limfosit manusia individual terhadap radiasi dari donor berbagai umur. Kedua analisis dilakukan dalam tiga kelompok dewasa, berumur antara 18-65 tahun dengan dua kali waktu sampling, setelah iradiasi dosis terapeutik 2 Gy elektron secara *in vitro*. Hasilnya menunjukkan tidak ada perbedaan nyata secara statistik dari aberasi *exchange* yang terbentuk. Hasil data aberasi total menunjukkan variabilitas lebih besar dan nyata secara statistik pada kelompok umur lebih tua daripada dua kelompok lainnya. Studi juga menunjukkan sedikit kenaikan kejadian mikronuklei secara spontan dengan umur dan ada variasi jumlah mikronuklei akibat radiasi di antara individu dari kelompok umur yang sama. Penelitian ini mengklaim bahwa uji mikronukleus lebih sensitif daripada analisis aberasi kromosoma untuk menentukan radiosensitivitas individual. Dari segi proteksi radiasi, para peneliti dari India melakukan pengujian keandalan senyawa (*E*)-4-[4-*N,N*-dimethylaminophenyl]but-3-en-2-one (DMAP) yang mungkin dapat digunakan untuk menekan pembentukan MN (polikromatik mikronuklei).³² Hal ini masih perlu diteliti lebih jauh

menggunakan berbagai macam senyawa yang bersifat protektif seperti ginseng.

PENUTUP

Dalam makalah ini telah dibahas satu dari sekian banyak teknik dan uji yang diandalkan oleh para peneliti, praktisi kedokteran dan petugas keselamatan untuk mengetahui besarnya dosis radiasi yang diterima oleh korban kecelakaan atau untuk uji dosis pada pasien radioterapi. Untuk menjamin keselamatan pekerja, para ahli menekankan pentingnya pembatasan waktu pajanan radiasi dan oleh karena itu para pekerja tidak diperbolehkan bekerja pada waktu yang lama pada satu jenis kegiatan saja. Biomonitoring individual (dosimetri fisik dan biologi) harus diberlakukan disertai penerapan peraturan yang ketat dalam proteksi radiasi dalam kerangka studi genetik. Pengobatan medis korban kecelakaan radiasi harus dibantu dengan hasil perkiraan dosis individual biologik. Uji klinis biodosimetri ini meliputi penentuan aberasi kromosom dalam limfosit darah perifer, penentuan laju penurunan cacah limfosit darah absolut, dan penentuan waktu munculnya frekuensi atau keparahan sindrom radiasi seperti muntahan korban.

Analisis kromosom merupakan “gold standard” untuk biodosimetri. Aberasi kromosom disentrik dan cincin serta mikronuklei berhubungan erat dengan dosis radiasi, dan yang terbaik adalah hubungan linear-kuadratik. Dengan perkembangan teknologi, deteksi aberasi tersebut dilakukan menggunakan hibridisasi *probe* (pelacak) terhadap sentromer dan metafase dengan perkembangan teknologi mutakhir dapat dilakukan secara otomatis. Sejumlah 20 metafase cukup dihitung untuk perkiraan awal dosis. Akan tetapi analisis kromosom yang baik umumnya membutuhkan waktu 4-5 hari (meliputi 1 hari sebelum pengambilan darah, dua hari untuk inkubasi, dan satu hari untuk menghitung metafase oleh seorang ahli dosimetri.³³ Untuk dosis radiasi tinggi, para ahli menggunakan teknik PCC yang efektif dalam penentuan dosis tinggi. Mikronuklei yang penghitungannya relatif jauh lebih cepat dan mudah dibandingkan dengan aberasi kromosom ternyata kurang sensitif bila dibandingkan dengan kromosom disentrik. Kebolehjadian mikronuklei secara spontan lebih besar (sekitar 10-20 kali) dari kromosom disentrik menjadikan uji ini menjadi perhitungan tersendiri.

DAFTAR PUSTAKA

1. METTLER, F.A., Jr. and MOSELEY, R.D., Jr., Medical Effects of Ionizing Radiation, Grune & Stratton, Inc., Orlando, Florida, 1985.
2. NATIONAL RESEARCH COUNCIL, COMMITTEE ON BIOLOGICAL EFFECTS OF IONIZING RADIATION, Health Effects of Exposure to Low Levels of Ionizing Radiation, BEIR V, National Academy Press, Washington, D.C., 1990.
3. SCHWARTZ, J.L., JORDAN, R., LENARCZYK, M. and LIBER, H.L., Delayed genomic instability in human lymphoblasts exposed to ¹³⁷Cs γ -rays radiation, *Radiation Research*, 159, 730-736, 2003.
4. EDWARDS, A., Biological dosimetry: A FISHy story, National Radiological Protection Board, Chilton, 2006.
5. MULLER, W.U., and STEFFER, C., Biological indicators for radiation damage, *International Journal of Radiation Biology*, 59, 863-873, 1991.
6. BARBOSA, I.S., MAGNATA, S.P., AMARAL, A., SOTERO, G. and MELO H.C., Dose assessment by quantification of chromosome aberrations

- tions and micronuclei in peripheral blood lymphocyte from patients exposed to gamma radiation, *Genetics and Molecular Biology*, 28, 452-457, 2005.
7. NOWELL, P.C., Phytohemagglutinin initiator of mitosis in cultures of normal human leukocytes, *Cancer Research*, 20, 462-466, 1960.
 8. INTERNATIONAL ATOMIC ENERGY AGENCY, Cytogenetic analysis for radiation dose assessment, Technical Report Series no. 405, Vienna, 2001.
 9. MULLER, W.U. and STREFFER, C., Biological indicators for radiation damage, *International Journal of Radiation Biology*, 59, 863-873, 1991.
 10. KANDA, R., HAYATA, J., and LLOYD, D.C., Easy biodosimetry for high-dose radiation exposures using drug induced, prematurely condensed chromosomes, *International Journal of Radiation Biology*, 75, 441-446, 1999.
 11. LAMADRID, A.I., GARCIA, O., DELBOS, M., VOISIN, P., and ROY, L., PCC-ring induction in human lymphocytes exposed to gamma and neutron irradiation, *Journal of Radiation Research*, 48, 1-6, 2007.
 12. WOJCIK, A., STEPHAN, G., SOMMER, S., BURACZEWSKA, I., KUSZEWSKI, T., WIECZOREK, A., and GOZDZ, S., Chromosomal aberration and micronuclei in lymphocytes of breast cancer patients after an accident during radiotherapy with 8 MeV electrons, *Radiation Research*, 160, 677-683, 2003.
 13. BLAKELY, W.F., PRASANNA, P.G., GRACE, M.B., and MILLER, A.C., Radiation exposure assessment using cytological and molecular biomarkers, *Radiation Protection Dosimetry*, 97(1), 17-23, 2001.
 14. SASAI, K., EVANS, J.W., KOVACS, M.S., and BROWN, J.M., Prediction of human cell radiosensitivity: comparison of clonogenic assay with chromosome aberrations scored using premature chromosome condensation with fluorescence *in situ* hybridization, *International Journal of Radiation Oncology Biology and Physics*, 30(5), 1127-1132, 1994.
 15. KOTELES, G.J., The human lymphocytes micronucleus assay. A review on its application in occupational and environmental medicine, *Centr Europ J Occup Environ Med*, 2, 12-30, 1996.

16. THOMAS, P., UMEGAKI, K., and FENECH, M., Nucleoplasmic bridges are a sensitive measure of chromosome rearrangement in the cytokinesis-block micronucleus assay, *Mutagenesis*, 18(2), 187-194, 2003.
17. RAMIREZ, A. and SALDANHA, P.H., Micronucleus investigation of alcoholic patients with oral carcinomas, *Genetics and Molecular Research*, 1(3), 246-260, 2002.
18. VRAL, A., THIERENS, H. and DE RIDDER, L., In vitro micronucleus-centromere assay to detect radiation-damage induced by low doses in human lymphocytes, *International Journal of Radiation Biology*, 71, 61-68, 1997.
19. PROSSER, J.S., MOQUET, J.E., LLOYD, D.C., and EDWARDS, A.A., Radiation induction of MN in human lymphocytes, *Mutation Research*, 199, 37-45, 1988.
20. BOCKER, W., STREFFER, C., MULLER, W.U. and YU, C., Technical report automated scoring of micronuclei in binucleated human lymphocytes, *International Journal of Radiation Biology*, 70(5), 529-537, 1996.
21. SMOLEWSKI, P., RUAN, Q., VELLON, L., and DARZYNKIEWICZ, Z., Micronuclei assay by laser scanning cytometry, *Cytometry*, 45, 19-26, 2001.
22. KOKSAL, G., LLOYD, D.C., EDWARDS, A.A., and PROSSER, J.S., The dependence of the micronucleus yield in human lymphocytes on culture and cytokinesis blocking times, *Radiation Protection Dosimetry*, 29(3), 209-212, 1989.
23. DOWNING, G.J., Biomarkers and surrogate endpoints in clinical research: definitions and conceptual model, Dalam: Biomarker: Clinical Research and Applications (Downing, G.J. ed.), Elsevier, Amsterdam, 1-9, 2000.
24. LEE, T-K., ALLISON, R. R., O'BRIEN, K. F., NAVES, J. L., KARLSSON, U. L. and WILEY, A. L., Jr. Persistence of micronuclei in lymphocytes of cancer patients after radiotherapy. *Radiation Research*, 157, 678-684, 2002.
25. VRAL, A., THIERENS, H., and DE RIDDER, L., In vitro micronucleus-centromere assay to detect radiation-damage induced by low doses in human lymphocytes, *International Journal of Radiation Biology*, 71, 61-68, 1997.

26. LE ROUX, J., SLABBERT, J., SMITH, B., and BLEKKENHORST, G., Assessment of the micronucleus assay as a biological dosimeter using cytokinesis-blocked lymphocytes from cancer patients receiving fractionated partial body-radiotherapy, *Strahlenther Onkol.*, 174(2), 75-81, 1998.
27. CATENA, C., CONTI, D., PARASACCHI, P., MARENCO, P., BORTOLATO, B., BOTTURI, M., LEONI, M., PORTALURI, M., PALEANI-VETTORI, P.G., and RIGHI, E., Micronuclei in cytokinesis-blocked lymphocytes may predict patient response to radiotherapy, *International Journal of Radiation Biology*, 70(3), 301-308, 1996.
28. LIVINGSTON, G.K., FOSTER, A.E., and ELSON, H.R., Effect of *in vivo* exposure to iodine-131 on the frequency and persistence of micronuclei in human lymphocytes, *Journal of Toxicology and Environmental Health*, 40(2-3), 367-375, 1993.
29. KIM, S.R., KIM, T.H., RYU, S.Y., LEE, H.J., OH, H., JO, S.K., OH, K.S., PARK, I.C., KIM, J.C., KANG, C.M., and KIM, S.H., Measurement of micronuclei by cytokinesis-block method in human, cattle, goat, pig, rabbit, chicken and fish peripheral blood lymphocytes irradiated *in vitro* with gamma radiation, *In Vivo*, 17(5), 433-438, 2003.
30. EREXSON, G.L., KLIGERMAN, A.D., BRYANT, M.F., SONTAG, M.R., and HALPERIN, E.C., Induction of micronuclei by X-radiation in human, mouse and rat peripheral blood lymphocytes, *Mutation Research*, 253(2), 193-198, 1991.
31. JOKSIC, G., NIKOLIC, M., and SPASOJEVIC-TISMA, V., Radiosensitivity of different aged human lymphocytes following electron irradiation *in vitro*, *Neoplasma*, 44(2), 117-121, 1997.
32. JAGETIA, G.C., JACOB, P.S., and RAO, M.N., (E)4-[4-N,N-dimethylaminophenyl]but-3-en-2-one (DMAP) treatment inhibits the radiation-induced micronucleus formation in bone marrow of BALB/c mice, *Mutation Research*, 306(1), 71-80, 1994.
33. DAINIAK, N., Response to and Management of a Radiological Crisis, Yale University School of Medicine, 2006.

