

EFEK RADIASI GAMMA TERHADAP VIABILITAS BAKTERI *Brucella abortus* CH 09 BL

The Effect of Gamma Radiation on Viability of Brucella abortus CH 09 BL Bacteria

Tri Handayani¹, Susan M. Noor², dan Fachriyan H. Pasaribu³

¹ Pusat Aplikasi Isotop dan Radiasi, Badan Tenaga Nuklir Nasional, Jl. Lebak Bulus Raya no 49, Jakarta Selatan 12440, Indonesia

² Balai Besar Penelitian Veteriner, Jl. RE. Martadinata No. 30, Bogor, Jawa Barat, Indonesia

³ Fakultas Kedokteran Hewan, Institut Pertanian Bogor, Jl. Agatis, Kampus IPB Dramaga, Bogor, Jawa Barat Indonesia

* E-mail korespondensi: trihanda@batan.go.id

ABSTRAK

Brucella abortus merupakan bakteri yang menyebabkan keguguran pada ternak atau sering disebut brucellosis. Penyakit ini bersifat zoonosis pada manusia yaitu menyebabkan demam undulan. Beberapa penelitian telah dilakukan untuk mengetahui efek radiasi gamma pada kelangsungan hidup mikroorganisme. Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui viabilitas bakteri *B. abortus* CH 09 BL yang diiradiasi dengan sinar gamma pada dosis 0, 50, 100, 150 dan 200 Gy sehingga diperoleh *Lethal dose-100* (LD₁₀₀). Isolat bakteri *B. abortus* CH 09 BL ditumbuhkan pada media TSA kemudian diamati koloni dan pertumbuhannya. Bakteri diiradiasi pada dosis 0 – 200 Gy dengan laju dosis 625 Gy/jam di *iradiator Gamma Chamber* PAIR BATAN. Pengujian viabilitas bakteri dilakukan dengan teknik pengenceran berseri kemudian dilakukan penghitungan bakteri dengan metode TPC. Viabilitas *B. abortus* CH 09 BL pasca radiasi pada dosis 0, 50, 100, 150 dan 200 Gy menunjukkan viabilitas masing-masing 100%; 13,33%; 0,33%; 0,17% dan 0,01%. Hasil penelitian ini belum dapat ditentukan LD₁₀₀ *B. abortus* CH 09 BL. Perlu dilakukan tahapan penelitian lebih lanjut untuk mendapatkan LD₁₀₀.

Kata kunci: viabilitas, *B. abortus* CH 09 BL, sinar Gamma, LD₁₀₀

ABSTRACT

Brucella abortus is bacteria that causes abortion in cattle. The disease is zoonotic in humans, which causes undulan fever. Several studies have investigated the effect of gamma radiation on the viability of microorganisms. The aim of this study is to determine the viability of *B. abortus* CH 09 BL bacteria which irradiated with Gamma rays doses of 0, 50, 100, 150 and 200 Gy that the *Lethal dose-100* (LD₁₀₀) is obtained. Isolate of bacteria *B. abortus* CH 09 BL were grown on TSA media then colonies and growth were observed. Bacteria irradiated at dose 0 - 200 Gy with dose rate 625 Gy /hour in Gamma Chamber Iradiator at PAIR BATAN. The examination of viability bacteria is conducted by serial dilution technique then bacteria counting by TPC method. The viability of *B. abortus* CH 09 BL post-radiation at doses of 0, 50, 100, 150 and 200 Gy show that the viability was 100%; 13.33%; 0.33%; 0.17% and 0.01% respectively. Based on the results, this study of LD₁₀₀ *B. abortus* CH 09 BL have not been defined. Further research needs to be done to get LD₁₀₀.

Keywords: viability, *B. abortus* CH 09 BL, gamma ray, LD₁₀₀

PENDAHULUAN

Brucella abortus merupakan bakteri yang dapat menyebabkan keguguran ternak pada trisemester ketiga [1]. Penyakit keguguran ini sering disebut juga brucellosis atau penyakit keluron menular. Pada betina dewasa yang bunting, ekskresi bakteri melalui plasenta, cairan janin dan kotoran vagina, selain itu juga kelenjar susu dan kelenjar getah bening yang akhirnya diekskresikan ke susu. Selain pada hewan betina, bakteri ini juga menyerang hewan jantan sehingga mengembangkan orchitis, epididimitis sehingga

penyakit brucellosis ini dapat menjadi penyebab infertilitas pada hewan betina dan jantan [2]. Usia, jenis kelamin, periode kebuntingan dan resistensi alami terhadap *Brucella* mempengaruhi perkembangan infeksi. Ternak betina bunting cenderung mudah terinfeksi daripada ternak tidak bunting atau jantan. Hal ini karena uterus ternak bunting terdapat gula erythritol yang menopang pertumbuhan bakteri *Brucella* [3].

Pada manusia, penyakit brucellosis bersifat zoonosis menyebabkan "demam undulant", "demam Mediterania" atau "demam Malta".

Kerugian ekonomi akibat bakteri ini sangat besar meliputi biaya pengobatan, berkurangnya pendapatan karena menurunnya aktivitas penderita, serta berkurangnya produk hewan [4].

Bakteri *Brucella* mempunyai ciri Gram negatif, tidak berspora, tidak motil, berbentuk kokobasilus dengan panjang 0,6–1,5 μm dan lebar 0,5–0,7 μm , bersifat fakultatif intraseluler yaitu bakteri mampu hidup dan berkembang biak dalam sel fagosit. Pada media padat, koloni *Brucella* terlihat setelah inkubasi selama 2-3 hari. Setelah inkubasi 4 hari, koloni berbentuk bulat, berdiameter 1-2 mm, dengan tepi halus, seperti madu pucat pada media transparan dan koloni convex [5]. Karakteristik spesies *Brucella* berdasarkan kebutuhan CO_2 dalam pertumbuhannya, produksi H_2S , aktivitas urease dan pertumbuhan pada thionin serta basic fuchsin [6].

Bakteri ini memiliki kemampuan untuk menginvasi berbagai jaringan hewan sehingga dapat menyebabkan bermacam-macam infeksi. Beberapa studi menunjukkan bahwa bakteri *B. abortus* dapat diperoleh dari sampel cairan higroma [7], membran dan liver fetus [8], susu [9, 10] dan darah [9]. Bakteri *Brucella* sangat tahan pada kondisi lingkungan. *Brucella* sensitif terhadap sinar matahari langsung, dan pasteurisasi. *Brucella* dapat hidup pada beberapa kondisi lingkungan, dimana pada kondisi kekeringan, dengan adanya bahan organik seperti protein, dan bertahan hidup dalam debu serta tanah [3].

Radiasi dapat diartikan energi yang dipancarkan dalam bentuk partikel atau gelombang [11]. Beberapa penelitian telah dilakukan untuk mengetahui efek radiasi gamma pada kelangsungan hidup mikroorganisme. Bagian sel yang akan kehilangan viabilitas akibat paparan radiasi gamma adalah molekul *deoxyribonucleic acid* (DNA). DNA merupakan sumber informasi genetik sel. Perubahan genetik sel akan berakibat pada terjadinya kerusakan sel bahkan kematian sel [11,12]. The Centre for Food Security & Public Health [13] menyatakan bahwa radiasi gamma digunakan sebagai desinfektan untuk mematikan bakteri *Brucella sp.* Penelitian viabilitas juga digunakan untuk menentukan dosis radiasi sinar gamma sebelum disuntikkan ke hewan percobaan pada pengembangan vaksin brucellosis [14]. Beberapa pengembangan vaksin hidup yang dilemahkan (*live attenuated*) untuk hewan memberikan

perlindungan namun masih virulen. Vaksin yang ideal dimana vaksin tersebut diharapkan mampu menimbulkan kekebalan dalam jangka panjang namun tidak bersifat virulen [15]. Oleh karena itu diperlukan informasi tentang viabilitas untuk menentukan dosis yang tepat pada pengembangan vaksin. Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui efek radiasi terhadap viabilitas bakteri *B. abortus* CH 09 BL yang diradiasi pada dosis berbeda sehingga diperoleh *Lethal dose*-100 (LD_{100}).

METODE PERCOBAAN

Bahan dan Alat

Bahan yang digunakan dalam penelitian adalah bakteri *B. abortus* CH 09 BL, media *Tryptone soya agar* (TSA), *Tryptone soya broth* (TSB), pewarna Gram dan larutan saline. Peralatan yang digunakan adalah *Biological safety cabinets* (BSC) kelas IIA, mikroskop, spektrofotometer, *irradiator Gamma chamber, microtube*, tabung 10 ml, botol roux, automatic pipette 1 - 10 ml, tip, inkubator CO_2 Panasonic, ose, bunsen, cawan Petri, vortex, *glass bead* dan refrigerated sentrifus Sorvall.

Tata Kerja

Pemurnian bakteri

Bakteri *B. abortus* CH 09 BL ditumbuhkan pada media TSA selama 3 hari. Selanjutnya bakteri yang tumbuh dibuat preparat dan pewarnaan Gram. Preparat diamati menggunakan mikroskop pada perbesaran 10 x 100 [5].

Kurva tumbuh bakteri

Bakteri diinokulasikan pada media TSB kemudian diinkubasi pada suhu 37 °C di inkubator CO_2 . Pengamatan pertumbuhan dilakukan dengan mengukur *optical Density* (OD) suspensi bakteri menggunakan spektrofotometer pada panjang gelombang 640 nm.

Radiasi bakteri *B. Abortus*

Bakteri dikultur dalam Botol Roux, dan diinkubasi sesuai fase *log* titik pertumbuhan tercepat pada suhu 37 °C dengan penambahan 5% CO_2 . Pemanenan bakteri dilakukan dengan menambahkan 15 ml larutan saline dan *glass bead* ke dalam botol roux, kemudian suspensi bakteri yang diperoleh diambil dengan pipet kaca. Suspensi bakteri disentrifuse pada 3000 rpm selama 10–15 menit dengan refrigerated sentrifus Sorvall [16,17]. Supernatan dibuang dan pelet yang terbentuk di dasar tabung sentrifuse dicuci

dengan larutan saline sebanyak dua kali. Setelah itu pelet dilarutkan dengan larutan saline sehingga diperoleh jumlah sel 10^8 sel/ml. Suspensi bakteri dimasukkan dalam 5 tabung radiasi masing-masing sebanyak 5 ml. Kemudian bakteri diiradiasi pada dosis 0, 50, 100, 150 dan 200 Gy dengan laju dosis 625 Gy/jam di Iradiator Gamma Chamber PAIR BATAN. Setelah itu bakteri dilakukan pengenceran berseri pada media TSA. Bakteri diinkubasi selama 3-5 hari di dalam inkubator CO₂.

Analisis Data

Jumlah koloni bakteri di agar plate dihitung dengan metode *Total Plate Count* (TPC). Penghitungan persen (%) viabilitas menggunakan persamaan jumlah koloni bakteri hidup setelah radiasi/jumlah koloni bakteri kontrol (tanpa radiasi) x 100%. Selanjutnya dibuat grafik hubungan antara dosis radiasi Gamma dan viabilitas bakteri (%).

HASIL DAN PEMBAHASAN

Hasil pengamatan isolat *B. abortus* CH 09 BL dengan pewarnaan Gram menunjukkan bakteri berwarna merah yang menandakan bahwa bakteri termasuk dalam Gram negatif (Gambar 1). Struktur dinding bakteri *Brucella* seperti bakteri Gram negatif lainnya yang terdiri dari membran plasma, periplasma, peptidoglikan dan membran luar. Membran luar tersusun dari fosfolipid, lipopolisakarida (LPS), lipoprotein, dan protein. LPS mengandung lipid A dan O polisakarida [18]. Hal tersebut karena komponen membran luarnya didominasi oleh LPS.

Pemeriksaan secara mikroskopik terlihat bakteri berwarna merah, berbentuk coccobacillus (batang pendek), tidak bergerak, dan memiliki kecenderungan sendiri-sendiri ataupun berpasangan (Gambar 1). Dahouk & Nockler [19] menyatakan bahwa bakteri *Brucella sp.* secara mikroskopik seperti "fine sand".

Pertumbuhan bakteri *B. abortus* CH 09 BL terlihat dalam kurva pertumbuhan bakteri yang diketahui dengan periode inkubasi seperti terlihat pada Gambar 2. Kurva ini diperlukan untuk menentukan fase logaritmik dari bakteri sebelum dilakukan radiasi.

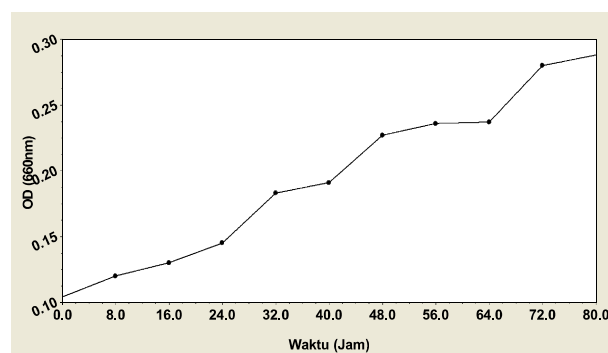
Kurva tumbuh bakteri menunjukkan pembelahan tertinggi atau fase logaritmik diperoleh pada jam ke-80. Fase logaritmik bakteri menunjukkan lebih dari 3 hari, hal tersebut sesuai dengan karakter dari bakteri *B. abortus* yang

dikenal *fastidious bacteria*, dimana bakteri sulit untuk tumbuh dan lambat pertumbuhannya [5,19].



Gambar 1. Bakteri *B. abortus* CH 09 BL (tanda panah). pada perbesaran 1000x

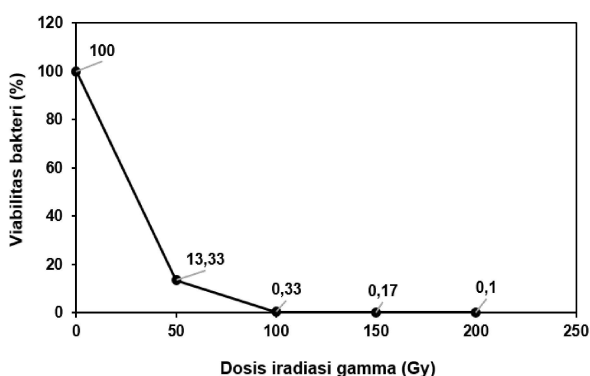
Selain *Brucella sp* terdapat bakteri lain yang lambat pertumbuhannya seperti *Legionella sp.*, *Francisella tularensis*, *Leptospira sp.*, *Borrelia burgdorferi*, dan *Bartonella* [20]. Pertumbuhan bakteri *Brucella* biasanya muncul setelah 3–4 hari, namun kultur tidak boleh dibuang dan dapat dinyatakan sebagai negatif setelah 7-10 hari [2].



Gambar 2. Pertumbuhan bakteri *B. abortus* CH 09 BL pada media TSB

Viabilitas sel dapat diartikan sebagai potensi atau kemungkinan sel untuk dapat hidup setelah terpapar suatu bahan. Jumlah bakteri *B. abortus* yang digunakan untuk mengetahui viabilitas sebanyak 10^8 sel/ml. Pengaruh beberapa dosis bertingkat pada *B. abortus* dapat dilihat pada Gambar 3. Berdasarkan Gambar 3 dapat

diketahui bahwa jumlah bakteri mengalami penurunan ketika diberikan perlakuan dosis radiasi yang berbeda. Pada dosis radiasi kontrol (0 Gy), menunjukkan viabilitas bakteri paling banyak yaitu 100%. Saat dosis radiasi dinaikkan menjadi 50 Gy terjadi penurunan jumlah bakteri yang signifikan dengan nilai viabilitas 13,33 %. Demikian pula ketika *B. abortus* CH 09 BL diberikan paparan dosis radiasi 100 Gy, 150 Gy dan 200 Gy masing-masing menunjukkan viabilitas berturut turut yaitu 0,33 %; 0,17% dan 0,01%.



Gambar 3. Hubungan antara dosis radiasi dengan viabilitas bakteri

Pemanfaatan radiasi sinar Gamma untuk berbagai tujuan karena kemampuan penetrasinya yang tinggi. Teknik radiasi sinar gamma telah digunakan untuk inaktivasi mikroorganisme patogen [21]. Salah satu sumber sinar Gamma yang digunakan dalam radiasi dihasilkan dari radioisotop Cobalt – 60. Beberapa bakteri Gram negatif seperti seperti *Escherichia coli*, *Yersinia enterocolitica*, *Aeromonas hydrophila* and *Campylobacter spp.* sangat sensitif terhadap radiasi [21]. *Brucella abortus* sebagai salah satu bakteri Gram negatif memiliki karakteristik yang sama.

Penurunan viabilitas bakteri *B. abortus* CH 09 BL seperti terlihat di Gambar 3 berhubungan dengan efek radiasi Gamma terhadap sel dimana terjadi efek langsung dan tidak langsung. Efek langsung yaitu terjadinya pemutusan ikatan senyawa-senyawa penyusun sel. Sedangkan efek tidak langsung terjadi karena komponen terbanyak sel adalah air dimana apabila terpapar sinar Gamma akan mengalami hidrolisis dan menghasilkan radikal bebas. Radikal bebas tersebut akan menyebabkan kerusakan materi sel.

Salah satu komponen sel yaitu DNA, dimana DNA merupakan target utama ketika terpapar radiasi. Akibatnya DNA akan mengalami pemutusan rantai dan dapat kembali menyusun ulang urutan basa nitrogennya. Penyusunan kembali tersebut dapat sama atau berbeda dengan semula. Penyusunan ulang yang berbeda dapat berakibat pada kematian sel, mutasi atau transformasi [12].

Berdasarkan Gambar 3 diketahui bahwa peningkatan dosis radiasi berpengaruh terhadap viabilitas bakteri *B. abortus* CH 09 BL. Namun pada penelitian ini belum diperoleh kematian bakteri *B. abortus* CH 09 BL seluruhnya (LD₁₀₀) sehingga diperlukan penelitian lanjutan.

KESIMPULAN

Hasil penelitian menunjukkan bahwa viabilitas *B. abortus* CH 09 BL pasca radiasi pada dosis 0, 50, 100, 150 dan 200 Gy yaitu 100%; 13,33%; 0,33%; 0,17% dan 0,01%. Sehingga dari hasil penelitian ini belum dapat ditentukan LD₁₀₀ *B. abortus* CH 09 BL. Perlu dilakukan tahapan penelitian lebih lanjut untuk mendapatkan LD₁₀₀.

UCAPAN TERIMA KASIH

Penulis mengucapkan terima kasih kepada Supartono dan Sumirah, A.Md. dari Balai Besar Penelitian Veteriner atas bantuannya selama penelitian dan Pusat Aplikasi Isotop dan Radiasi BATAN yang telah membiayai penelitian ini .

DAFTAR PUSTAKA

- [1]. S. Parthiban, S. Malmarugan, M. S. Murugan, J. J. Rajeswar, and P. Pothiappan, "Review on Emerging and Reemerging Microbial Causes in Bovine Abortion," *Int. J. Nutr. Food Sci.*, vol. 4, pp. 1–6, 2015.
- [2]. OIE, "Brucellosis," in *OIE Terrestrial Manual 2016*, 2016.
- [3]. V. N. Bharde and V. M. Bhuktar, "Zoonotic Importance of Brucellosis," *Anim. Husb. Dep. Pune*, pp. 4–15, 2005.
- [4]. M. J. Corbel, *Brucellosis in humans and animals*. World Health Organization WHO., 2006.
- [5]. G. Alton, L. Jones, R. Angus, and J. Vengr, *Techniques for The Brucellosis Laboratory*. Paris: Institute National De La Recherche Agronomique, 1988.
- [6]. F. C. Quinn P.J., B. K. Markey, M. E.

- Carter, W.J.Donnely, “Veterinary Microbiology and Microbial Disease,” Leonard Blackwell publishing., 2002, pp. 162–167.
- [7]. H. Chisi, S. L., Marageni, Y., Naidoo P, Zulu, G., Akol, G. W. Herdenn, “An evaluation of serological tests in the diagnosis of bovine brucellosis in naturally infected cattle in KwaZulu-Natal province in South Africa,” *J. S. Afr. Vet. Assoc.*, pp. 1–7, 2017.
- [8]. C. Mathew, M. Stokstad, T. B. Johansen, S. Klevar, R. H. Mdegela, G. Mwamengele, P. Michel, L. Escobar, D. Fretin, and J. Godfroid, “First isolation , identification , phenotypic and genotypic characterization of *Brucella abortus* biovar 3 from dairy cattle in Tanzania,” *BMC Vet. Res.*, pp. 1–9, 2015.
- [9]. S. Islam, A. Islam, M. M. Khatun, S. Saha, S. Basir, and M.-M. Hasan, “Molecular Detection of *Brucella* spp . from Milk of Seronegative Cows from Some Selected Area in Bangladesh,” *J. Pathog.*, vol. 2018, 2018.
- [10]. D. R. Mugizi, S. Muradrasoli, S. Boqvist, J. Erume, G. W. Nasinyama, C. Waiswa, G. Mboowa, M. Klint, and U. Magnusson, “Isolation and Molecular Characterization of *Brucella* Isolates in Cattle Milk in Uganda,” vol. 2015, 2015.
- [11]. G. Saha, *Physic and Radiobiology of Nuclear Medicine*. Springer, 2006.
- [12]. D. Tetriana and I. Sugoro, “Aplikasi teknik nuklir dalam bidang vaksin,” pp. 1–4, 2007.
- [13]. CSFPH, “Brucellosis,” 2018, pp. 1–14.
- [14]. N. Sanakkayala, A. Sokolovska, J. Gulani, H. Hogenesch, N. Sriranganathan, M. Stephen, G. G. Schurig, R. Vemulapalli, “Induction of Antigen-Specific Th1-Type Immune Responses by Gamma-Irradiated Recombinant *Brucella abortus* RB51,” 2005.
- [15]. D. M. Magnani, J. S. Harms, M. A. Durward, and G. A. Splitter, “Nondividing but Metabolically Active Gamma-Irradiated *Brucella melitensis* Is Protective against Virulent *B. melitensis* Challenge in Mice □,” vol. 77, no. 11, pp. 5181–5189, 2009.
- [16]. Y. A. El-zawahryt and N. Grecz, “Inactivation and Injury of *Yersinia enterocolitica* by Radiation and Freezing,” vol. 42, no. 3, pp. 464–468, 1981.
- [17]. Cassidy II CC, “*Brucella abortus* Strain RB51 Outer Membrane Vesicles as a Vaccine Against Brucellosis in a Murine Model,” The faculty of the Virginia Polytechnic Institute and State University., 2010.
- [18]. W. Christie, *Lipid A and Bacterial Lipopolysaccharides*. Scottish Crop Research Institute (and Mylnefield Lipid Analysis), Invergowrie, Dundee (DD2 5DA), Scotland, 2010.
- [19]. S. Al Dahouk and K. Nöckler, “therapy Implications of laboratory diagnosis on brucellosis therapy,” vol. 7210, 2014.
- [20]. G. V Doern, “Detection of Selected Fastidious Bacteria,” *Clin. Infect. Dis.*, no. January, pp. 166–173, 2000.
- [21]. G. M. Belbe and M. T. Ä, “Effects of Ionizing Radiation on Microbiological Contaminants of Foods,” *Bull. UASVM Agric.*, vol. 67, no. 2, pp. 178–185, 2010.

PERTANYAAN SAAT PRESENTASI

1. **Pertanyaan (Enny Rimita S. (Pusat Penelitian Bioteknologi, LIPI)):**

- 1) Apakah ada penelitian lanjutan untuk melanjutkan penelitian ini terkait produk apa yang ingin dihasilkan berdasarkan penelitian ini?
- 2) Bila belum ada penelitian lanjutannya, apakah ada gambaran/tujuan akhir dalam bentuk produk berdasarkan penelitian yang telah dilakukan ini?

Jawaban:

- 1) Penelitian ini merupakan penelitian awal dan akan ada penelitian lanjutan. Pada tahap ini baru sampai pengamatan viabilitas bakteri *abortus* akibat beberapa dosis radiasi sinar gamma dari sumber Cobalt 60.
- 2) Tujuan akhir penelitian adalah untuk pengembangan vaksin iradiasi *brucellosis* pada ternak.

ANALISIS SITOGENETIK DAN SNPs PADA SEL LIMFOSIT PEKERJA RADIASI MEDIK

Cytogenetic and SNPs Analysis in Lymphocyte Cells of Medical Radiation Workers

Yanti Lusiyanti*, Viria Agesti Sufivan, Masnelly Lubis, Suryadi, Harry Nugroho Eko Surniyantoro, Sofiaty Purnami, dan Nastiti Rahajeng

Pusat Teknologi Keselamatan dan Metrologi Radiasi, Badan Tenaga Nuklir Nasional
Jl. Lebak Bulus Raya No. 49, Jakarta Selatan 12440, Indonesia
*E-mail korespondensi: k_lusiyanti@batan.go.id

ABSTRAK

Aplikasi radiasi di bidang medik merupakan penyumbang terbesar dari paparan radiasi yang diterima oleh populasi dunia. Paparan radiasi pada tubuh dapat menimbulkan kerusakan pada kromosom dan DNA yang dapat dideteksi pada sel darah tepi. Tujuan penelitian ini adalah untuk menganalisis efek sitogenetik pada tingkat sel (kromosom) dan DNA (SNPs) pada pekerja akibat paparan radiasi medik. Sampel darah sebanyak 5-10 mL diambil dari pekerja radiasi dan pekerja non radiasi (kontrol). Pemeriksaan kromosom dilakukan dengan menggunakan metode standar IAEA yang telah dimodifikasi, sedangkan pemeriksaan deteksi *single nucleotide polymorphisms* (SNPs) dilakukan untuk gen *DNA repair* pada XRCC1 exon 10 menggunakan metode PCR-RFLP. Hasil pemeriksaan kromosom disentrik pada pekerja radiasi maupun kontrol masih dalam kisaran normal dan tidak diperoleh perbedaan yang signifikan. Sedangkan deteksi SNPs pada gen XRCC1 exon 10 menunjukkan frekuensi mutan lebih rendah dibanding *wild-type*. Tidak diemukan kerusakan kromosom disentrik maupun SNPs pada limfosit pekerja radiasi yang diakibatkan oleh paparan radiasi medik.

Kata kunci: kromosom, disentrik, single nucleotide polymorphisms, gen DNA repair, XRCC1

ABSTRACT

The application of radiation in the medical field is the largest contributor of exposure to radiation received by the world's population. The exposure to radiation in the human body can cause the chromosomes and DNA damage which are able to be assayed in peripheral blood cells. The aim of the present study was to obtain cytogenetic effects on cell (Chromosome) and DNA (SNPs) levels at workers due to medical radiation. Blood samples of 5-10 mL were taken from radiation workers and non radiation workers (controls). Cytogenetic examinations of chromosome were performed using modified standard method of IAEA, meanwhile detection of single nucleotide polymorphisms (SNPs) was performed for DNA repair XRCC1 exon 10 gene using PCR-RFLP method. The results showed that the dicentric chromosomes of radiation workers were at the normal range which was not significantly different as compared to controls. Meanwhile, the SNPs analysis on XRCC1 exons 10 genes showed that the frequencies of the mutant was lower than that the wild-types. There were no chromosome damage nor SNPs in the lymphocytes of radiation workers caused by medical radiation exposure .

Keywords: chromosome, dicentric, polymorphisms, DNA repair genes, XRCC1

PENDAHULUAN

Radiasi pengion diketahui sebagai pisau bermata dua yang dapat dimanfaatkan dengan optimal jika mengikuti ketentuan keselamatan radiasi dan untuk mencegah efek deterministik serta memperkecil risiko efek stokastik yang ditimbulkan akibat paparan radiasi. Pemantauan terhadap penggunaan sumber radiasi di bidang medik di Indonesia sangat perlu dilakukan pada tingkat nasional untuk mengetahui tingkat radiasi dan potensi efek radiasi yang ditimbulkan dan juga dalam rangka memberikan kontribusi untuk mendukung program pemantauan radiasi bidang medik di tingkat internasional yang dilakukan oleh *United Nations Scientific Committee on the*

Effects of Atomic Radiation (UNSCEAR). Penggunaan radiasi dalam bidang kesehatan diantaranya untuk diagnostik (CT-Scan, fluoroskopi intervensional), radioterapi, dan kedokteran nuklir. Pemeriksaan diagnostik radiologi telah menjadi bagian yang tidak dapat dipisahkan dari kehidupan sehari-hari, terutama di dalam penatalaksanaan klinis pasien di dalam pelayanan kesehatan [1]. Aplikasi tersebut mempunyai manfaat yang cukup besar dan potensi bahaya radiasi yang perlu diwaspadai, sehingga pemanfaatan teknologi ini harus berwawasan keselamatan yaitu dengan membuat peraturan yang ketat dan dilaksanakan dengan seksama serta dilakukan pengawasan agar potensi

itu tidak menjadi kenyataan. Pekerja radiasi berpotensi menerima paparan radiasi dengan besaran dosis ekuivalen yang melebihi atau mendekati nilai batas dosis yang diizinkan sehingga menyebabkan terjadinya suatu kecelakaan yang dikarenakan tata kerja yang salah [2].

Radiasi pengion adalah gelombang elektromagnetik (foton) atau partikel berenergi yang akan menimbulkan proses ionisasi bila melewati materi, termasuk materi biologi. Tingkat kerusakan yang ditimbulkan pada tubuh sangat bergantung antara lain pada karakteristik jenis radiasi yang mempunyai daya tembus dan tingkat ionisasi yang berbeda. Interaksi radiasi dengan materi biologi diawali dengan terjadinya interaksi fisik yaitu terjadinya proses eksitasi dan/atau ionisasi, yang diikuti dengan interaksi fisikokimia, respon biologi dan diakhiri dengan timbulnya efek radiasi [2,3]. Efek radiasi pengion pada manusia merupakan hasil dari proses fisika dan kimia yang terjadi segera setelah paparan, kemudian diikuti dengan proses biologis dalam tubuh. Proses tersebut meliputi rangkaian perubahan pada tingkat molekuler, seluler maupun jaringan tubuh. Paparan radiasi pengion dapat menginduksi mutasi dan transformasi sel terutama sebagai konsekuensi dari kerusakan pada materi genetik sel (sitogenetik) yaitu DNA dan kromosom. Proses tersebut meliputi rangkaian perubahan pada tingkat molekuler, seluler maupun jaringan tubuh [4]. Paparan radiasi dari sumber radiasi eksternal maupun internal yang diterima pasien ataupun pekerja medis sebagai bagian dari diagnosis atau pengobatan medis disebut dengan paparan medis. Protein, membran sel dan DNA menjadi sasaran paparan radiasi dan efeknya dapat berupa kerusakan langsung dan tidak langsung [4,5]. Kerusakan langsung pada struktur tersebut karena radiasi berinteraksi dengan struktur molekul DNA sehingga DNA mengalami kerusakan, sedangkan kerusakan tidak langsung terjadi karena radiasi menghantam molekul air dan membentuk radikal bebas seperti hidrosil dan alkoksi. Radikal bebas yang terbentuk akan merusak struktur DNA dan menyebabkan kematian sel. Kerusakan DNA yang diakibatkan radiasi meliputi *single strand breaks* (SSB), *double strand breaks* (DSB), kerusakan basa dan ikatan silang (*cross-link*) protein-DNA. DSB merupakan lesi kritis utama yang mengarah ke aberasi kromosom [6]. Radiasi pengion

berinteraksi dengan sel dan menyebabkan efek merusak terutama pada DNA. Enzim perbaikan DNA dalam sel akan mencegah kerusakan akibat radiasi pengion. Beberapa jenis enzim perbaikan DNA seperti *XRCC1*, *XRCC3*, *XPB* berperan dalam menjaga integritas struktural DNA dan mencegah kerusakan DNA [7,8].

Single nucleotide polymorphisms (SNPs) merupakan tipe polimorfisme yang paling banyak ditemukan pada manusia dengan frekuensi $\geq 1\%$ dalam populasi. SNPs yang terjadi pada gen perbaikan DNA dapat menyebabkan penurunan kemampuan perbaikan DNA, peningkatan laju mutasi dan risiko munculnya kanker [9]. Protein *XRCC1* membentuk kompleks dengan *DNA polymerase beta*, *DNA ligase III* dan *poly-ADP-ribose polymerase (PARP)* dalam perbaikan kerusakan DNA untai tunggal [10]. Sebuah asosiasi yang kuat antara alel varian *XRCC1* codon 399/exon 10 sebagai faktor risiko kanker kepala dan leher, adenokarsinoma paru-paru [11] dan kanker payudara [8]. Terbentuknya varian 399gln/*XRCC* exon 10 telah terbukti berasosiasi dengan penurunan kapasitas perbaikan DNA repair dan meningkatnya risiko beberapa jenis kanker [12]. Asosiasi antara berbagai polimorfisme genetik dan petanda molekuler perantara yang terlibat dalam kaskade kejadian genotoksik / karsinogenik dapat memberikan informasi yang berguna pada efek modulasi polimorfisme genetik, kerentanan individu terhadap karsinogen lingkungan dan pekerjaan serta kemungkinan hubungan antara polimorfisme gen perbaikan DNA dan laju perbaikan/repair DNA individu.

Tujuan dari penelitian ini adalah untuk memperoleh data efek sitogenetik (DNA dan kromosom) pada pekerja radiasi akibat paparan radiasi medik dari divisi kedokteran nuklir dan radiologi intervensional di Rumah Sakit tipe A di Jakarta. Data yang diperoleh diharapkan dapat, memberikan manfaat dalam hal pemantauan dosis radiasi diterima pekerja untuk menerapkan ketentuan Kesehatan dan Keselamatan Kerja (K3) dengan radiasi.

METODE PERCOBAAN

Subyek Penelitian

Sampel darah diperoleh dari 43 pekerja radiasi (radiografer, perawat dan dokter spesialis) dan 10 pekerja Administrasi (kontrol) dengan kisaran umur 25-71 tahun dan masa kerja 3-48

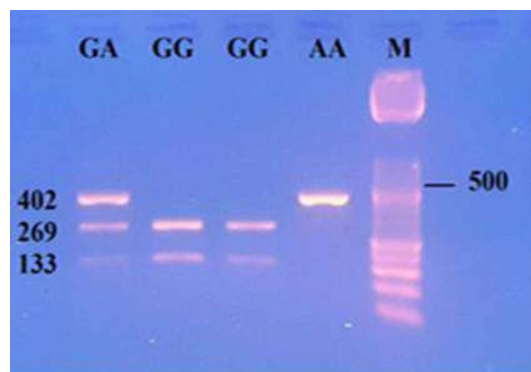
tahun. Pengambilan sampel dilakukan pada tahun 2015 di rumah sakit di Jakarta. Setiap donor telah mengisi kuesioner terkait biodata riwayat paparan dan kesehatan serta menandatangani *informed consent*. Pelaksanaan terhadap sampling pengambilan sampel pekerja radiasi di rumah sakit dilaksanakan setelah diperoleh persetujuan *Ethical approval* nomor LB.02.01/5.2/KE 171/2016.

Pembiakan dan pemanenan sel darah untuk pemeriksaan aberasi kromosom.

Sampel darah selanjutnya dibiakkan dalam botol biakan yang telah berisi media pertumbuhan yang terdiri dari RPMI-1640, Fetal Bovine Serum, PHA (Phytohemagglutinin) dan penisilin streptomycin menggunakan metode standar pembiakan Laboratorium Sitogenetik PTKMR. Botol biakan disimpan dalam inkubator 37 °C selama 48 jam. Pada 3 jam sebelum panen, ditambahkan 2,5% kolhisin untuk menghentikan proses pembelahan dan mengkondisikan sel pada tahap metaphase. Selanjutnya dilakukan proses panen terhadap darah selama 10 menit. Supernatan dibuang dan endapan darah diaduk dengan pipet pasteur lalu disimpan di *waterbath* selama 25 menit. Selanjutnya biakan tersebut di *sentrifugasi* kembali dengan kecepatan yang sama, supernatan dibuang dan pada endapan ditambahkan kembali larutan fiksatif yang terdiri dari metanol dan asam asetat glasial (3:1). Tahapan ini diulang 2-3 kali sampai diperoleh sedimen limfosit yang berwarna putih. Sedimen limfosit selanjutnya dibuat preparat dan diwarnai dengan pewarna giemsa. Untuk pengamatan aberasi kromosom digunakan mikroskop dengan perbesaran 1000 X untuk setiap sampel. Hasil pemeriksaan pada total 42 pekerja radiasi medik dengan latar belakang pekerjaan dari divisi Kedokteran Nuklir dan Radiologi Intervensi serta 10 responden dari administrasi sebagai kontrol. Dosis penerimaan tahunan masih dibawah Nilai Batas Dosis (NBD), yaitu < 20 mSv/tahun. Pengamatan sebaran kromosom tahap metafase dilakukan apabila kromosom berjumlah 46 buah kemudian dilakukan penghitungan frekuensi kromosom disentrik. (sesuai dengan standar Protocol IAEA) [2,13].

Deteksi SNPs untuk DNA repair pada XRCC1 exon 10 (Arg399Gln)

Polimorfisme gen XRCC1 exon 10 dilakukan dengan menggunakan teknik *Polymerase Chain Reaction-Restriction Fragment Length Polymorphism* (PCR-RFLP) [14] dimana *primer forward* yang digunakan adalah 5'- AGTAGTCTGCTGGCTCTGG-3' dan *primer reverse* 5'- TCTCCCTTGGTCTCCAACCT-3'. Reaksi PCR dilakukan dengan denaturasi 95 °C selama 3 menit, diikuti oleh 30 siklus terdiri dari denaturasi 15 detik pada suhu 95 °C, *annealing* 15 detik pada suhu 60 °C dan *extention* 15 detik pada suhu 72 °C dan akhirnya *final extention* 1 menit pada suhu 72 °C. Setelah amplifikasi, produk PCR didigesti dengan menggunakan 10 UI enzim restriksi *MspI* (BioLabs, Inc.) selama 3 jam pada suhu 37 °C, dan kemudian dielektroforesis pada gel agarose 3%. Genotipe GG (*wildtype*) untuk kodon 399 ditentukan oleh adanya dua pita pada 269 dan 133 bp, genotip GA (mutan heterozigot) ditentukan oleh adanya tiga pita pada 402, 269 dan 133 bp, sedangkan genotip AA (mutan homozigot) ditentukan oleh adanya pita 402 bp.

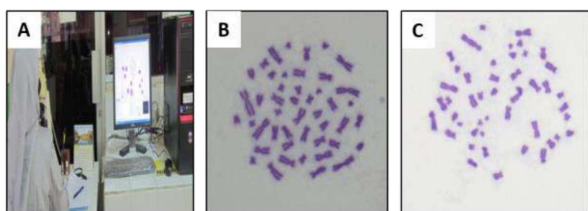


Gambar 1. Hasil elektroforesis dan posisi pita untuk polimorfisme gen XRCC1 exon 10

HASIL DAN PEMBAHASAN Pemeriksaan aberasi kromosom

Dalam penelitian ini proses pemeriksaan dilakukan secara konvensional menggunakan mikroskop cahaya dan visualisasi sel metaphase kromosom ditampilkan pada Gambar 2. Hasil pengamatan yang telah diperoleh dari total 10500 sel metaphase pekerja radiasi dan 2500 sel metaphase control ditampilkan pada Table 1. Hasil pemeriksaan sampel pekerja radiasi menunjukkan data sitogenetik untuk kromosom

disentrik hanya ditemukan masing-masing 1 disentrik pada 4 sampel pekerja radiasi (0,03 %). Frekuensi kelainan tersebut sekitar 0,00038 dari sekitar 10500 sel metafase. Namun secara umum tidak ditemukan perbedaan bermakna antara pekerja radiasi dan kontrol. Frekuensi ini masih dalam kisaran normal mengacu pada manual IAEA [2] yang menyatakan bahwa frekuensi latar kromosom disentrik untuk individu normal adalah 1-3/1000 sel metaphase. Kromosom disentrik bersifat tidak stabil, artinya sel yang mengandung kromosom ini akan mengalami kematian pada proses mitosis sel [2,4]. Frekuensi ini jauh lebih rendah dibanding hasil penelitian Farideh Zakeri dkk [15] yang melaporkan frekuensi aberasi kromosom disentrik yang ditemukan pada pekerja radiasi adalah 0.0019 dari sekitar 6315 sel metafase. Hasil analisis berdasarkan pengelompokan masa kerja dengan median masa kerja 8 tahun ditampilkan pada Gambar 3.



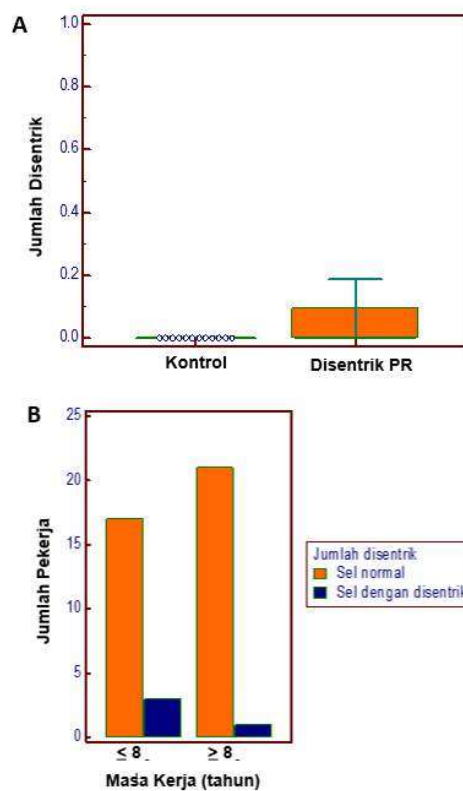
Gambar 2. Pengamatan mikroskopis dengan mikroskop cahaya (A), sel metafase kromosom normal (B), dan sel metafase kromosom yang mengandung disentrik (C).

Tabel 1. Hasil pengamatan aberasi kromosom berdasarkan pengelompokan masa kerja

Kelompok	Σ N	Umur (Th)	Σ Sel Metafase	Disentrik	P
Pekerja radiasi	42	42,71 ±	10500	4	0,32
Kontrol	12	10,58	2500	0	
Masa kerja ≤ 8 tahun	20		5000	3	0,3
Masa kerja ≥ 8 tahun	22		5500	1	

Berdasarkan pengelompokan masa kerja, sebanyak 3 pekerja yang memiliki sel yang mengandung kromosom disentrik pada kelompok dengan median masa kerja kurang dari 8 tahun dan sebanyak 1 pekerja yang memiliki sel yang mengandung 1 disentrik pada pekerja dengan

masa kerja yang diatas 8 tahun. Berdasarkan analisis statistik, hasil tersebut mengindikasikan bahwa probabilitas terbentuknya aberasi kromosom disentrik tidak berkaitan dengan masa kerja. Penelitian yang sama telah dilaporkan oleh Rapolo [16] yang menyatakan bahwa lamanya kerja tidak berpengaruh terhadap pembentukan aerasi kromosom. Pada penelitian ini latar belakang pekerjaan tidak dikelompokkan secara spesifik, perlu penelitian lebih komprehensif untuk mengetahui apakah jenis pekerjaan berpengaruh terhadap kemungkinan terjadinya pembentukan aberasi kromosom.



Gambar 3. Frekuensi sel yang mengandung kromosom disentrik pada pekerja radiasi medik (PR) dan kontrol (A), dan frekuensi kromosom disentrik berdasarkan masa kerja ≤ 8 tahun (A) dan ≥ 8 tahun (B).

Pemeriksaan SNPs untuk DNA repair pada XRCC1 exon 10 (Arg399Gln)

Hasil deteksi genotip yang telah dilakukan terhadap para pekerja radiasi maupun kontrol menunjukkan bahwa populasi berada pada keseimbangan Hardy-weinberg ($P= 0.155$). Frekuensi alel G= 0,66 dan alel A = 0,34. Berdasarkan pemeriksaan genotip yang telah dilakukan untuk gen XRCC1 exon 10 pada

pekerja radiasi maupun kontrol mempunyai pola genotip GG,GA,AA dan alel G dan A. Indikasi polimorfisme genotip AA pada gen XRCC1 exon 10 ditemukan pada pekerja radiasi maupun kontrol. Hal ini menunjukkan bahwa polimorfisme dapat terjadi secara alamiah (proses kesalahan replikasi DNA). Ryu [7] yang menyatakan bahwa laju mutasi DNA dapat terjadi pada individu sehat sekitar 1%. Pada hasil penelitian lain [18] menggunakan XRCC exon 10 untuk mengetahui polimorfisme dari DNA repair gene XRCC 1 pada pekerja yang terekspos zat *cytostatic* dan hasil penelitian melaporkan bahwa terjadi kenaikan genotip XRCC varian homozigot dibanding kan dengan genotype *wild type* atau genotype heterozigot.

Perlu dilakukan penelitian lebih lanjut terkait asosiasi antara berbagai polimorfisme genetik dan penanda molekuler perantara seperti mikronuklei yang terlibat dalam kaskade kejadian genotoksik / karsinogenik yang dapat memberikan informasi yang berguna pada efek modulasi polimorfisme genetik, pada kerentanan individu dan pada kemungkinan hubungan antara polimorfisme perbaikan DNA dan laju perbaikan/repair DNA individu.

KESIMPULAN.

Pemeriksaan pada sampel darah limfosit pekerja radiasi menunjukkan bahwa pada semua pekerja radiasi tersebut tidak ditemukan kerusakan pada DNA dan kromosom. Frekuensi kelainan kromosom dan DNA para pekerja berada dalam kisaran normal.

UCAPAN TERIMA KASIH

Penelitian ini telah terlaksana dengan dana DIPA PTKMR. Penulis mengucapkan banyak terima kasih kepada seluruh responden pekerja radiasi di Rumah Sakit di Jakarta yang telah bersedia sebagai donor/volunter.

DAFTAR PUSTAKA

- [1]. UNSCEAR (United Nations Scientific Committee on the Effects of Atomic Radiation). Sources and Effects of Ionizing Radiation. Report to the General Assembly, Volume II: Effects. New York: United Nations, 2000.
- [2]. International Atomic Energy Agency. Cytogenetic Dosimetry: Applications in Preparedness for and Response to

Radiation Emergencies. IAEA, Vienna, 2011.

- [3]. Badan Pengawas Tenaga Nuklir, Penyuluhan Peraturan Perundangan Keselamatan Nuklir, Jakarta, 2002.
- [4]. E. J. Hall and A. J. Gioccia, Radiobiology for the Radiobiologist, 7th ed, J. B. Lippincott Company, Philadelphia, 2012.
- [5]. Daly J., Karen W, Rhonda S., et. al. "Hierarchy of Evidence for Assessing Qualitative Health Research, Journal of Clinical Epidemiology 60, 2007.
- [6]. Venkatachalam P., Solomon F. D., Prabhu B. K., Mohankumar M. N., Gajendiran N, Jeevanram R. K., Estimation of Dose in Cancer Patients Treated with Fractionated Radiotherapy Using Translocation, Dicentrics and Micronuclei Frequency in Peripheral Blood Lymphocytes. 429:1–12, Mutat Res, 1999.
- [7]. Seedhouse C., Bainton R., Lewis M., Harding A, Russell N, Das- Gupta E, The genotype distribution of the XRCC1 gene indicates a role for base development of therapy related acute myeloblastic leukemia. Blood. 100, 3761–3766, 2002.
- [8]. Stern M. C., Umbach D. M., Lunn R. M., Taylor J. A., DNA repair gene XRCC3 codon 241 polymorphism, its interaction with smoking and XRCC1 polymorphisms, and bladder cancer risk. Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev. 11 939-43. 2002.
- [9]. Ochiai H. Single-Base Pair Genome Editing in Human Cells by Using Site-Specific Endonucleases. Int J Mol Sci; 16(9): 21128-37, 2015.
- [10]. Divine K. K., Gilliland F. D., Crowell R. E., Stidley C. A., Bocklage T. J., Cook D. L., Belinsky S. A., The XRCC1 399 glutamine allele is a risk factor for adenocarcinoma of the lung. Mutat Res ; 461: 273–78, 2001.
- [11]. Duell E. J., Millikan R. C., Pittman G. S., Winkel S, Lunn R. M., Tse C. K., Eaton A, Mohrenweiser H. W., Newman B, Bell D. A., Polymorphisms in the DNA repair gen XRCC1 and breast cancer. Cancer Epidemiol Biomarkers Prev;10; 217-222, 2001.
- [12]. Norppa, H. . "Cytogenetic Biomarkers and Genetic Polymorphisms." 149: 309–34, 2004.

- [13]. Lusiyanti, Y et al. "Dose-Response Curve of Chromosome Aberrations in Human Lymphocytes Induced by Gamma-Rays." *Atom Indonesia* 39(124): 6–10, 2013.
- [14]. Andreassi MG, Foffa I, Manfredi S, Botto N, Cioppa A, Picano E. Genetic polymorphisms in XRCC1, OGG1, APE1 and XRCC3 DNA repair genes, ionizing radiation exposure and chromosomal DNA damage in interventional cardiologists. *Mutat Res*; 666(1-2): 57-63, 2009.
- [15]. Farideh Z., Tomohisa H., Cytogenetic approach to the effects of Low levels of ionizing radiations on occupationally exposed individuals, *Eur J Radiol* 2;73(1):191-195, 2010.
- [16]. Rapolo, M., Balia C., Roggieri, P., et al. The Micronucleus assay as Biological Dosimeter in Hospital Workers Exposed to Low Doses Of Ionizing Radiation, *Mut Res* 747 7-13, 2012.
- [17]. Ryu R. A., Tae K., Min H. J., Jeong J. H., Cho S. H., Lee S. H., Ahn Y. H., XRCC1 Polymorphisms and risk of papillary thyroid carcinoma in a Korean sample. *J. Korean. Med. Sci.* 26 991-5, 2011.
- [18]. Musak L., Vodicka P., Klimentova G., Soucek P., Hanova M., Mikulkova R., Buchancova J., Vodickova L., Polakova, Pec M., Chromosomal damage and polymorphisms of DNA repair genes XRCC1 and XRCC3 in workers exposed to cytostatics, *Neuro Endocrinol Lett* 2:57-60, 2006.

PERTANYAAN SAAT PRESENTASI

1. Pertanyaan (Trio Hartono (RSUP Fatmawati)):

- 1) Kenapa dilakukan pemeriksaan terhadap kromosom dan bagaimana dengan hasil yang diperoleh?
- 2) Pemeriksaan mutasi polimorfisme yang telah dilakukan sejauh mana hasil yang ditemukan pada pekerja radiasi?

Jawaban:

- 1) Berdasarkan acuan IAEA, indikator spesifik akibat paparan radiasi pengion pada individu yang terpapar adalah abrasi kromosom disentrik.
- 2) Berdasarkan pemeriksaan polimorfisme yang telah dilakukan pada gen XRCCI exon 10 pada pekerja radiasi menunjukkan bahwa indikasi polimorfisme genotif AA ditemukan baik pada pekerja maupun kontrol. Hal ini menunjukkan bahwa polimorfisme dapat terjadi secara alamiah sesuai acuan literatur.

2. Pertanyaan (Arief A. (PAIR, BATAN)):

- 1) Apakah abrasi kromosom disentrik dapat di repair? Adakah hubungan antara masa kerja dengan terbentuknya kromosom disentrik?
- 2) Penggunaan gen XRCC1 exon 10 spesifikasi pada deteksi SNPs sebagai penanda apa?

Jawaban:

- 1) Tipe abrasi kromosom disentrik adalah jenis abrasi kromosom tak stabil/ bukan kerusakan permanen, sel yang memiliki kromosom disentrik akan mengalami kematian karena tidak bisa ikut dalam pembelahan sel. Tidak ada pengaruh antara masa kerja dengan kromosom disentrik yang terbentuk.
- 2) Polimorfisme gen yang dideteksi bertautan dengan gen yang mengkode protein perbaikan DNA seluler, Polimorfisme ini dapat menyebabkan ketidak stabilan genom dan menurunnya kemampuan sel untuk memperbaiki DNA yang rusak.