



# Uji Mutagenisitas Benzo( $\alpha$ )piren dengan Metode Mikronukleus pada Sumsum Tulang Mencit Albino (*Mus musculus*)

Yana Sumpena\*, Rochestri Sofyan\*, Rusi Rusilawati\*\*

\*Pusat Penelitian dan Pengembangan Teknik Nuklir - BATAN, \*\*Universitas Pendidikan Indonesia

## ABSTRAK

Benzo ( $\alpha$ ) piren (BP) sebagai senyawa yang bersifat karsinogen diduga dapat menimbulkan kerusakan pada kromosom. Salah satu cara pemeriksaan kerusakan kromosom adalah dengan uji mikronukleus (MN). Efek mutagenik dari BP telah diteliti menggunakan uji MN pada sel eritrosit polikromatik (PCE) dari sumsum tulang femur mencit albino. Mencit albino diberi perlakuan dengan menginjeksikan larutan BP 0,3% (b/v) sebanyak 0,1 ml pada daerah tengkuk secara subkutan, sebanyak sepuluh kali dalam interval waktu satu hari. Setelah 120 hari, baik mencit perlakuan maupun kontrol dibunuh dengan cara dislokasi leher, diambil sumsum tulang femurnya, lalu dibuat preparat apusan dengan pewarnaan Giemsa. Terbentuknya MN pada sel PCE diamati di bawah mikroskop dengan pembesaran 2000 kali. Banyaknya MN dalam sel PCE atau MNPCE dihitung per 1000 sel PCE, yang kemudian disebut sebagai frekuensi MNPCE, dengan satuan permil. Hasil pengamatan menunjukkan bahwa pemberian BP dapat menyebabkan frekuensi MNPCE menjadi  $38,82 \pm 8,70$  permil ( $n=10$ ) dibandingkan dengan kontrol dengan frekuensi MNPCE sebesar  $2,19 \pm 0,99$  permil ( $n=10$ ). Kenaikan frekuensi MNPCE yang cukup besar tersebut menunjukkan bahwa BP memiliki efek mutagenik dengan tingkat mutagenisitas yang cukup tinggi.

*Kata kunci: benzo ( $\alpha$ ) piren, mikronukleus, karsinogen.*

## PENDAHULUAN

Perkembangan teknologi yang pesat dewasa ini, telah mengakibatkan pencemaran lingkungan yang makin berat. Sejalan dengan itu maka perlu dilakukan suatu penelitian tentang respon biologik dari xenobiotik atau senyawa yang bersifat racun, untuk dapat memahami efeknya terhadap tubuh manusia.

Salah satu xenobiotik yang cukup akrab dengan kehidupan manusia sehari-hari adalah benzo( $\alpha$ )piren (BP). BP merupakan senyawa hidrokarbon polisiklik aromatik yang digolongkan sebagai senyawa pro karsinogen kuat. Senyawa ini dijumpai di lingkungan sebagai hasil pirolisis lemak atau sebagai hasil proses pembakaran yang tidak sempurna, seperti pada daging panggang, sate, makanan yang diasap, asap rokok dan asap kendaraan bermotor<sup>(1,2,3)</sup>.

Hingga saat ini masih terus berkembang anggapan BP sebagai penyebab kanker. Sebagai senyawa karsinogen, BP dapat menimbulkan mutasi gen yang dapat dimanifestasikan sebagai kerusakan kromosom, yaitu terjadi aberasi atau terbentuk patahan-patahan kromosom.

Pada tahap telofase, fragmen kromosom dan atau massa kromatin dalam sel akan tertinggal pada sitoplasma membentuk struktur menyerupai inti sel dengan diameter antara 1/20 sampai 1/5 diameter inti yang dinamai mikronukleus(MN)<sup>(4)</sup>. Jadi terbentuknya mikronukleus pada sel merupakan indikasi terjadinya aktivitas mutagenik yang merusak kromosom.dan akhirnya memicu terjadinya kanker. Metode penentuan MN yang cukup sederhana dapat dilakukan pada sel PCE dari apusan sumsum tulang hewan rodensia<sup>(5)</sup>. Penelitian ini dilakukan untuk mengetahui efek mutagenik BP, melalui uji MN pada sel PCE yang diambil dari sumsum tulang femur mencit albino.

## BAHAN DAN TATA KERJA

Bahan kimia yang digunakan dalam penelitian ini berkualitas proanalisis diperoleh dari E. Merck terdiri atas: BP, metanol, etanol, larutan garam fisiologis, larutan pewarna Giemsa yang telah diencerkan lima kali dalam metanol dan *Oleum olivarum*. Peralatan yang digunakan adalah kaca objek, *standing jar*, berbagai alat gelas, alat suntik, kandang tikus dan mikroskop Nikon MM-21 dengan pembesaran 2000 kali.

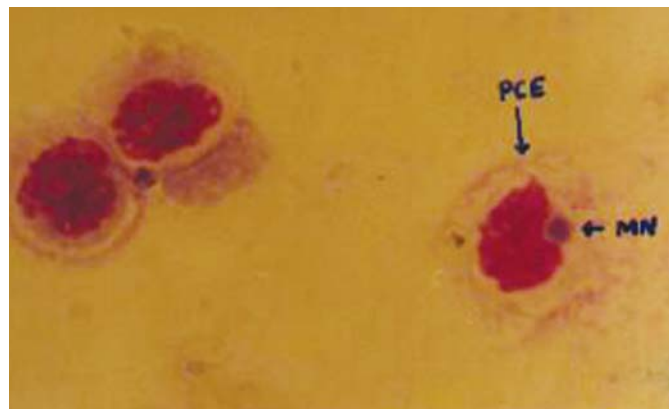


Hewan percobaan adalah mencit albino (*Mus musculus*) galur Swiss Webster yang dikembangkan di P3TKN. Mencit albino yang dipilih adalah yang berjenis kelamin betina dengan bobot badan antara 20 – 40 gram, berumur 2 – 3 bulan sebanyak 20 ekor (10 ekor perlakuan dan 10 ekor kontrol). Mencit dipelihara dalam ruangan dengan suhu berkisar antara 22 – 25° C dan kelembapan 70 – 80%. Pakan tikus terdiri atas pelet dan air minum yang diberikan secara *ad libitum*. Mencit disuntik dengan larutan BP dalam *oleum olivarum* secara subkutan di daerah interskapuler (tengkuk) dengan dosis 0,3 mg /0,1 ml sebanyak sepuluh kali dalam interval satu hari. Pengamatan dilakukan dua kali sehari selama 120 hari, saat benjolan kanker pada mencit telah tumbuh optimal. Pembuatan dan pewarnaan preparat dilakukan menurut metode Schmid<sup>(6)</sup>. Hewan perlakuan yang telah diamati selama 120 hari dan juga hewan kontrol dibunuh dengan cara dislokasi leher, lalu dibedah; tulang femurnya diambil dan dibersihkan dari perlekatan otot dengan pisau bedah dan *tissue*. Ujung proksimal tulang ini digunting dan sumsumnya diaspirasi dengan sempit berisi 1 ml larutan garam fisiologis (NaCl 0,9%). Suspensi sumsum tulang disentrifuga selama 10 menit dengan kecepatan 1000 rpm, lalu endapannya diambil dan dibuat preparat apusan pada kaca objek. Setelah dikeringkan satu malam untuk fiksasi, preparat diwarnai dengan pewarna Giemsa dalam metanol. Pertama-tama preparat kering dimasukkan ke dalam larutan metanol absolut yang dituang ke dalam *standing jar* selama 30 menit, setelah itu preparat dipindahkan ke dalam *standing jar* lain yang berisi pewarna Giemsa-metanol dan dibiarkan lagi selama 30 menit. Preparat yang sudah diwarnai ini selanjutnya dicuci dengan air mengalir dan dibiarkan kering. Untuk mempertajam perbedaan antara sel PCE dengan sel yang lain, preparat dicuci ulang dengan cara merendam secara berturut-turut dalam etanol 30%, 50%, 70%, 80% dan etanol absolut. Lama setiap perendaman 10 menit dan setiap selesai perendaman preparat dibilas dengan air mengalir dan dikeringkan. Terakhir direndam kembali dalam xylol selama 10 menit, dibilas dengan air mengalir dan dikeringkan.

Pengamatan MN pada preparat dilakukan dengan mikroskop dengan pembesaran 2000 kali. Pada sumsum tulang terdapat berbagai variasi tipe sel yang dapat digunakan untuk penghitungan MN. Untuk mengurangi jumlah variabel pengganggu yang dapat mempengaruhi pengamatan, maka pemeriksaan MN hanya dilakukan pada satu tipe sel yaitu hanya pada sel PCE. Keuntungannya adalah sel PCE pada preparat mudah dikenali dari warnanya yang relatif kontras dibandingkan sel lain. Sel PCE merupakan sel eritrosit muda yang baru mengalami mitosis dan sintesis DNA, mengandung banyak ribosom serta memiliki inti. Selain warnanya relatif kontras, ukurannya relatif besar dan penyebarannya terbatas dibandingkan dengan sel lain maupun sel eritrosit dewasa atau sel eritrosit normokromatik (NCE). Pemeriksaan dilakukan dengan cara mengamati struktur MN pada sel PCE selanjutnya disebut MNPCE dan menghitungnya untuk tiap 1000 sel PCE. Jumlah MNPCE dalam 1000 sel PCE kemudian disebut sebagai frekuensi MNPCE yang dinyatakan dalam permil.

## HASIL DAN PEMBAHASAN

Secara teoritis MN adalah kromatin sitoplasmik yang tampak sebagai inti kecil terbentuk dari fragmen atau patahan kromosom yang diasingkan dari inti (nukleus), pada tahap anafase pembelahan sel. Setelah mencapai tahap telofase, elemen sentris menjadi inti sel anak, sedang fragmen kromosom yang tertinggal tetap berada pada sitoplasma membentuk inti kecil yang disebut MN. Zat asing bersifat karsinogen seperti BP, berpengaruh pada proses pembelahan sel. Kanker berawal dari kelainan gen yaitu pada kromosom. Terjadinya kerusakan kromosom yang mengarah ke kanker, dapat termanifestasikan sebagai terbentuknya MN. Jadi terbentuknya MN setelah pemberian BP menandakan bahwa BP karsinogenik. Pada penelitian ini sumsum diambil dari tulang femur atas pertimbangan bentuk tulang femur lurus dan ukurannya relatif besar, sehingga pengambilan sumsum lebih mudah. Struktur MN yang teramati di bawah mikroskop dengan pembesaran 2000 kali tampak sebagai bintik hitam berbentuk bulat atau hampir lonjong, terletak eksentrik atau agak perifer pada sel PCE, dengan diameter antara 1/20 – 1/5 kali diameter inti (Gb. 1).



Gambar 1. Penampakan MN pada sel PCE mencit albino yang diinduksi kanker dengan BP

Hasil penelitian diperoleh dari sepuluh tikus (perlakuan) dan sepuluh tikus (kontrol); menunjukkan bahwa pemberian BP dapat meningkatkan frekuensi MNPCE sampai  $38,82 \pm 8,70$  permil ( $n=10$ ) dibandingkan dengan kontrol  $2,19 \pm 0,99$  permil ( $n=10$ ). Dari data ini terbukti bahwa BP karsinogenik yang juga ditunjukkan oleh hasil pengamatan morfologik terjadinya benjolan di tengkuk tikus. Nilai frekuensi MNPCE yang cukup tinggi setelah pemberian BP menunjukkan bahwa mutagenisitas BP cukup tinggi. Sayangnya hingga saat ini belum ada ketentuan nilai batas ambang frekuensi MNPCE. Akan tetapi mengingat terjadinya kanker melewati proses yang panjang dan dapat berawal dari setitik kelainan<sup>(7)</sup>, maka kenaikan frekuensi MNPCE sekecil apapun perlu disikapi. Sebagai pembanding, herbisida paraquat juga dapat menginduksi frekuensi MNPCE pada konsentrasi 57,38 dan 66,56 mg/kg bobot badan masing-masing menjadi  $8,4 \pm 1,6$  permil dan  $10,6 \pm 1,9$  permil dengan frekuensi MNPCE kontrol sebesar  $2,4 \pm 1,4$  permil.<sup>(8)</sup>



Nilai ini tidak sebesar nilai yang diperoleh pada pemberian BP, padahal paraquat termasuk herbisida kelas dua ditinjau dari dampak kesehatan terhadap manusia (WHO). Bahkan di Malaysia pemakaiannya sangat dibatasi dan mendapat pengawasan yang cukup ketat. Akan tetapi perlu diingat pula bahwa pada penelitian uji mutagenitas paraquat digunakan tikus *Wistar (Rattus norvegicus)*, sedang pada penelitian ini digunakan mencit albino yang ukuran dan bobot tubuhnya lebih kecil yaitu sekitar 1/5 bobot tikus Wistar.

Dari pengalaman penentuan MN, penggunaan mencit sebagai hewan percobaan penanganannya lebih mudah dan praktis dibandingkan dengan penggunaan tikus. Penelitian ini dapat dilanjutkan ke arah penggunaan parameter MN antara lain untuk uji kemanjuran obat antikanker misalnya dari zat bioaktif tanaman obat, dengan cara mengamati perubahan frekuensi MNPCE pada sumsum tulang tikus yang telah diinduksi kanker dengan BP.

#### SIMPULAN

Pemeriksaan MN pada sel PCE dari tulang femur mencit albino dapat digunakan untuk mengamati adanya paparan xenobiotik. Dilihat dari frekuensi MNPCE-nya, BP memiliki efek mutagenik dengan tingkat mutagenitas cukup tinggi.

#### DAFTAR PUSTAKA

1. Atlas RM, Cerniglia CE. Bioremediation of petroleum pollutants: Diversity and environmental aspects of hydrocarbon biodegradation. *Bioscience* 1995; 45 (5): 25-40
2. Tandjojo N. Pengaruh Benzo ( $\alpha$ ) piren terhadap Beberapa Sifat Biokimia Khamir. Disertasi FMIPA-ITB 1992.
3. Noor Cholies, Komponen Herba *Veronica cinneria* yang Berkhasiat Anti Kanker. Disertasi, FMIPA-ITB 1982.
4. Fenech M, Marley AA. Measurement of micronuclei in lymphocytes. *Mut.Res.* 1985; 147 : 29-40.
5. Auletta A. Current status of short term test for carcinogenicity. *J. Env. Sci. Health* 1991; 8 (1): 31-43.
6. Schmid W. The micronucleus test. *Mut. Res.* 1975; 31: 9 -15.
7. Weinberg RA. How cancer arises. *Scient Am.* September 1996 : 32-40.
8. Hadiansyah C, Yunarni E, Hartati T. Uji mutagenitas herbisida paraquat dengan metoda mikronukleus pada sumsum tulang tikus Wistar. *Pros. Kongres HITOKSI Jakarta 22 - 23 Februari 1999.* Himpunan Toksikologi Indonesia, 2000: 67-77.

**→ Kami tunggu tulisan Anda mengenai:**

