

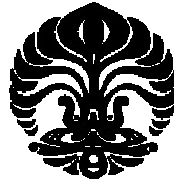
UNIVERSITAS INDONESIA

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

SKRIPSI

**SHERLY MEILIANI
0606070964**

**FAKULTAS MATEMATIKA DAN ILMU PENGETAHUAN ALAM
PROGRAM STUDI FARMASI
DEPOK
JULI 2010**



UNIVERSITAS INDONESIA

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

SKRIPSI

**Diajukan sebagai salah satu syarat untuk memperoleh gelar
Sarjana Farmasi**

**SHERLY MEILIANI
0606070964**

**FAKULTAS MATEMATIKA DAN ILMU PENGETAHUAN ALAM
PROGRAM STUDI FARMASI
DEPOK
JULI 2010**

HALAMAN PERNYATAAN ORISINALITAS

Skripsi ini adalah hasil karya saya sendiri, dan semua sumber baik yang dikutip maupun dirujuk telah saya nyatakan dengan benar.

Nama : Sherly Meilianti

NPM : 0606070964

Tanda Tangan : 

Tanggal : 1 Juli 2010

HALAMAN PENGESAHAN

Skripsi ini diajukan oleh :
Nama : Sherly Meilianti
NPM : 0606070964
Program Studi : Farmasi
Judul Skripsi : Analisis *Adduct* DNA setelah Pemberian Natrium Nitrit dan Dimetilamin secara Berulang pada Tikus

Telah berhasil dipertahankan di hadapan Dewan Penguji dan diterima sebagai bagian persyaratan yang diperlukan untuk memperoleh gelar Sarjana Farmasi pada Program Studi Farmasi, Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Universitas Indonesia

DEWAN PENGUJI

Pembimbing I : Dr. Yahdiana Harahap, MS. (.....)
Pembimbing II : Santi Purna Sari, S. Si., M.Si. (.....)
Penguji I : Dr. Arry Yanuar, MS. (.....)
Penguji II : Dr. Herman Suryadi, MS. (.....)
Penguji III : Dra. Juheini, M.Si. (.....)

Ditetapkan di : Depok
Tanggal : ..x. Juli 2010

KATA PENGANTAR

Puji dan syukur penulis panjatkan kepada Tuhan Yang Maha Esa, atas segala berkat dan karunia, serta bantuan dan pertolongan yang telah diberikan sehingga penulisan skripsi dapat diselesaikan dengan baik.

Pada kesempatan ini, penulis mengucapkan terima kasih sebesar-besarnya kepada pihak-pihak yang telah membantu penulis, di antaranya:

1. Ibu Dr. Yahdiana Harahap, MS, selaku Ketua Departemen Farmasi FMIPA UI dan juga sebagai pembimbing I; dan Ibu Santi Purna Sari, S.Si., M.Si. selaku pembimbing II; yang dengan tulus dan sabar membimbing, memberikan dukungan baik moril maupun materil, arahan, bantuan, serta saran-saran selama penelitian berlangsung sampai tersusunnya skripsi ini.
2. Bapak Drs. Hayun, M.Si. selaku pembimbing akademik yang dengan tulus memberikan bimbingan serta dukungan kepada penulis selama menempuh pendidikan di Departemen Farmasi.
3. Semua dosen KBI Kimia Farmasi dan dosen KBI Farmakologi, atas semua masukan, saran dan bantuan selama penelitian berlangsung.
4. Rina Rahmawati, SFarm Apt., selaku Manager Teknis; Krisnasari Dianpratami, SFarm Apt., selaku Manager Administrasi; Utami Pravitasari, S.Si. selaku Supervisor Laboratorium Bioavailabilitas dan Bioekuivalensi Departemen Farmasi FMIPA UI; pak Surya, pak Hadison, pak Rustam, mba Mela, mba Arny, mba Catur atas segala arahan dan bantuan yang diberikan selama penelitian berlangsung.
5. Ibu Dewi, selaku pembimbing di Laboratorium Biologi Molekuler, pak Didin, pak Purwanto, mba Lisa, bu Yanti, dr. Bambang, pak Kasman serta semua karyawan instalasi Penelitian dan Pengembangan di RS. Kanker “Dharmais” yang senantiasa membantu penulis mengerjakan isolasi DNA.

6. Dosen, staff, dan seluruh keluarga besar farmasi yang namanya tidak bisa penulis sebutkan satu per satu di sini, terima kasih atas segala bentuk dukungan dan bantuan selama penulis menempuh pendidikan di Farmasi FMIPA UI.
7. Keluarga tercinta, terutama Mama, Papa, ko Aming, Alvin yang senantiasa memberikan doa, kasih sayang, motivasi, dukungan baik moril maupun materil.
8. Ferdian Jovan, yang selalu memberikan perhatian, semangat, dukungan, dan doa serta setia mendengarkan keluh kesah penulis.
9. Teman – teman tercinta, baik yang bersama – sama di laboratorium farmakologi, Abi, Rianti, Atma, Visto, Uni, Lita, Ayu, kak Reni, kak Anti, kak Rina, Sandy, Oliv, Celly dan kak Yuni; maupun di laboratorium Bioavaibilitas dan Bioekivalensi, Christina, Bu Sri, Bu Cici dan pak Zuliar atas kebersamaan dan motivasi yang diberikan
10. Teman – teman sebimbangan, Anisa dan Ani, kakak kelas, Jie Sherly (Far'05), Lia (Far'05), Kak Bitu (Far'04), Jie Oliph (Far'04), Ko Tris (Far'00), Jie Ira (Far '03), dan adik kelas, Vero (Far'07) serta teman – teman seperjuangan, Tuti, Eko, Jenny, Mega, Yoyon dan semua rekan Farmasi Angkatan 2006 atas persahabatan dan keceriaan yang diberikan.

Penulis menyadari bahwa dalam pelaksanaan dan penyusunan skripsi ini masih mempunyai banyak kekurangan. Namun penulis tetap berharap skripsi ini dapat memberikan manfaat bagi semua pihak yang membutuhkan. Terima kasih. Tetap Semangat dan selalu Percaya pada-Nya!

Penulis

2010

**HALAMAN PERNYATAAN PERSETUJUAN PUBLIKASI
KARYA ILMIAH UNTUK KEPENTINGAN AKADEMIS**

Sebagai sivitas akademik Universitas Indonesia, saya yang bertanda tangan di bawah ini:

Nama : Sherly Meilianti
NPM : 0606070964
Program Studi : S1 Farmasi
Departemen : Farmasi
Fakultas : Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam
Jenis karya : Skripsi

demikian demi pengembangan ilmu pengetahuan, menyetujui untuk memberikan kepada Universitas Indonesia Hak Bebas Royalti Noneksklusif (*Non-exclusive Royalty Free Right*) atas karya ilmiah saya yang berjudul :

“Analisis *Adduct* DNA setelah Pemberian Natrium Nitrit dan Dimetilamin secara Berulang pada Tikus”

beserta perangkat yang ada (jika diperlukan). Dengan Hak Bebas Royalti Noneksklusif ini Universitas Indonesia berhak menyimpan, mengalihmedia/format-kan, mengelola dalam bentuk pangkalan data (*database*), merawat, dan mempublikasikan tugas akhir saya selama tetap mencantumkan nama saya sebagai penulis/pencipta dan sebagai pemilik Hak Cipta.

Demikian pernyataan ini saya buat dengan sebenarnya.

Dibuat di : Depok

Pada tanggal : 1 Juli 2010

Yang menyatakan



(Sherly Meilianti)

ABSTRAK

Nama : Sherly Meilianti
Program Studi : Farmasi
Judul : Analisis *Adduct* DNA setelah Pemberian Natrium Nitrit dan Dimetilamin secara Berulang pada Tikus

Nitrosodimetilamin merupakan senyawa karsinogenik yang dapat terbentuk melalui reaksi nitrit dan dimetilamin yang sering ditemukan dalam makanan. Nitrosodimetilamin akan diaktivasi di hati dan mengalkilasi basa DNA sehingga terbentuk *adduct* DNA seperti O⁶-metilguanin dan N⁷-metilguanin yang berperan dalam karsinogenesis. Pada penelitian ini dilakukan pengisolasian DNA dari darah tikus yang diberikan prekursor nitrosodimetilamin yaitu natrium nitrit dan dimetilamin. *Adduct* DNA dapat diperoleh dari hidrolisis DNA dengan asam klorida pada suhu 70°C, kemudian *adduct* tersebut dianalisis menggunakan Kromatografi Cair Kinerja Tinggi dengan kolom penukar kation kuat (Supelcosil® LC-SCX, 5µm, 250 x 4,6 mm), fase gerak amonium fosfat dengan konsentrasi akhir 40 mM, kecepatan alir 1,5 ml/menit, suhu kolom 30°C dan diukur pada panjang gelombang eksitasi 286 nm dan emisi 366 nm. Metode yang digunakan memberikan hasil validasi yang baik berdasarkan hasil uji akurasi dan presisi yang memenuhi persyaratan, kurva kalibrasi yang linear, dan batas kuantitasi 22,5403 ng/ml. Tikus sebanyak 24 ekor dibagi menjadi enam kelompok yaitu dua kelompok diberikan nitrosodimetilamin sebagai kontrol positif, tiga kelompok diberikan prekursor dan satu kelompok adalah kontrol normal. Pengambilan darah dilakukan pada 1, 2 dan 4 jam setelah induksi terakhir. Setelah pemberian natrium nitrit 110 mg/kg bb dan dimetilamin (1:5) selama seminggu, belum terdeteksi adanya O⁶-metilguanin dan N⁷-metilguanin dalam darah tikus.

Kata kunci : *adduct* DNA, dimetilamin, Kromatografi Cair Kinerja Tinggi, natrium nitrit, nitrosodimetilamin, N⁷-metilguanin, O⁶-metilguanin

xiv+101 halaman: 22 gambar; 20 tabel; 15 lampiran

Daftar acuan : 41 (1984-2010)

ABSTRACT

Name : Sherly Meilianti
Program Study : Pharmacy
Title : Analysis of DNA Adducts during Recurrent Administration of Sodium Nitrite and Dimethylamine in Rats

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

Keywords : dimethylamine, DNA adducts, High Performance Liquid Chromatography, nitrosodimethylamine, N⁷-methylguanine, O⁶-methylguanine, sodium nitrite

xiv+101 pages : 22 figures; 20 tables; 15 appendices

Bibliography : 41 (1984-2010)

DAFTAR ISI

	Halaman
HALAMAN JUDUL	ii
HALAMAN PERNYATAAN ORISINALITAS	iii
LEMBAR PENGESAHAN	iv
KATA PENGANTAR	v
HALAMAN PERSETUJUAN PUBLIKASI KARYA ILMIAH	vii
ABSTRAK	viii
ABSTRACT	ix
DAFTAR ISI	x
DAFTAR GAMBAR	xi
DAFTAR TABEL	xiii
DAFTAR LAMPIRAN	xiv
BAB 1. PENDAHULUAN	1
1.1 Latar Belakang.....	1
1.2 Tujuan Penelitian.....	3
BAB 2. TINJAUAN PUSTAKA	4
2.1 Nitrosamin.....	4
2.2 Nitrosodimetilamin.....	5
2.3 Asam Nukleat.....	9
2.4 <i>Adduct</i>	11
2.5 Kromatografi Cair Kinerja Tinggi.....	13
2.6 Validasi Metode Analisis.....	19
2.7 Metode Lain yang Digunakan untuk Analisis <i>Adduct</i>	24
BAB 3. METODE PENELITIAN	26
3.1 Tempat dan Waktu.....	26
3.2 Alat.....	26
3.3 Bahan.....	26
3.4 Hewan Uji.....	27
3.5 Cara Kerja.....	27
BAB 4. HASIL DAN PEMBAHASAN	39
4.1 Pencarian Kondisi Optimal untuk Analisis N ⁷ -metilguanin dan O ⁶ -metilguanin.....	39
4.2 Validasi Metode Analisis.....	42
4.3 Reaksi DNA dengan Nitrosodimetilamin <i>in vitro</i>	45
4.4 Reaksi Guanin dengan Nitrosodimetilamin <i>in vitro</i>	46
4.5 Pemberian Perlakuan pada Hewan Uji.....	47
BAB V. KESIMPULAN DAN SARAN	54
5.1 Kesimpulan.....	54
5.2 Saran.....	54
DAFTAR ACUAN	55

DAFTAR GAMBAR

Gambar	Halaman
2.1. Rumus struktur nitrosamin.....	4
2.2. Struktur kimia dari nitrosodimetilamin.....	6
2.3. Metabolisme nitrosodimetilamin.....	7
2.4. Struktur kimia nukleotida penyusun asam nukleat.....	9
2.5. Struktur DNA.....	10
2.6. Basa Nitrogen yang ditemukan dalam asam nukleat.....	11
2.7. Struktur kimia basa-basa purin dan pirimidin serta posisi penyerangan DNA oleh zat karsinogen.....	11
4.1. Instrumentasi KCKT.....	59
4.2. Kromatogram campuran larutan standar guanin, adenin, N ⁷ -metilguanin, O ⁶ -Metilguanin dalam asam klorida 0,1 N.....	60
4.3. Kromatogram larutan standar guanin, adenin, N ⁷ -metilguanin, O ⁶ -metilguanin dalam asam klorida 0,1 N.....	61
4.4. Kurva kalibrasi standar N ⁷ -metilguanin.....	62
4.5. Kuva kalibrasi standar O ⁶ -metilguanin.....	62
4.6. Kromatogram endapan hasil reaksi DNA yang diisolasi dengan 0,751 ml nitrosodimetilamin dalam 1,0 mL dapar Tris-HCl 0,01 M pH 7,5 <i>in vitro</i> , setelah inkubasi selama 10 jam dan dihidrolisis dengan asam klorida 0,1 N pada suhu 70°C selama 30 menit.....	63
4.7. Kromatogram endapan hasil reaksi DNA yang diisolasi dengan 0,751 ml nitrosodimetilamin dalam 1,0 mL dapar Tris-HCl 0,01 M pH 7,5 <i>in vitro</i> , setelah inkubasi selama 10 jam dan dihidrolisis dengan asam klorida 0,1 N pada suhu 70°C selama 30 menit, setelah dilakukan spiking.....	63
4.8. Kromatogram supernatan hasil reaksi DNA yang diisolasi dengan 0,751 ml nitrosodimetilamin dalam 1,0 mL dapar Tris-HCl 0,01 M pH 7,5 <i>in vitro</i> , setelah inkubasi selama 10 jam dan dihidrolisis dengan asam klorida 0,1 N pada suhu 70°C selama 30 menit.....	64
4.9. Kromatogram endapan hasil reaksi 5 mg guanin dalam KH ₂ PO ₄ dengan 0,751 ml nitrosodimetilamin dalam 1,0 mL dapar Tris-HCl 0,01 M pH 7,5 <i>in vitro</i> , setelah inkubasi selama 6 jam dan dihidrolisis dengan asam klorida 0,1 N pada suhu 70°C selama 30 menit.....	65
4.10. Kromatogram endapan hasil reaksi 5 mg guanin dalam KH ₂ PO ₄ dengan 0,751 ml nitrosodimetilamin dalam 1,0 mL dapar Tris-HCl 0,01 M pH 7,5 <i>in vitro</i> , setelah inkubasi selama 6 jam dan dihidrolisis dengan asam klorida 0,1 N pada suhu 70°C selama 30 menit setelah spiking.....	65

4.11 Kromatogram supernatan hasil reaksi 5 mg guanin dalam KH_2PO_4 dengan 0,751 ml nitrosodimetilamin dalam 1,0 mL dapar Tris-HCl 0,01 M pH 7,5 in vitro, setelah inkubasi selama 6 jam dan dihidrolisis dengan asam klorida 0,1 N pada suhu 70°C selama 30 menit.....	66
4.12 Pengambilan darah dari tikus melalui <i>sinus orbital</i> mata.....	67
4.13 Hasil isolasi DNA.....	68
4.14 Kromatogram DNA hasil isolasi dari sampel darah tikus dalam 100 μl aquadest (tanpa hidrolisis).....	69
4.15 Kromatogram DNA hasil isolasi dari sampel darah tikus dalam 100 μl aquadest, disertai hidrolisis dengan asam klorida 0,1 N pada suhu 70°C selama 30 menit.....	70



DAFTAR TABEL

Tabel		Halaman
3.1	Perlakuan untuk orientasi dosis NaNO ₂	34
3.2	Kelompok perlakuan uji.....	36
4.1	Data waktu retensi (t _R), jumlah lempeng teoritis (N), HETP dan resolusi (R) kromatogram campuran guanin, adenin, N ⁷ -metilguanin dan O ⁶ -metilguanin pada fase gerak amonium fosfat dengan konsentrasi 60 mM.....	71
4.2	Data waktu retensi (t _R), jumlah lempeng teoritis (N), HETP dan resolusi (R) kromatogram campuran guanin, adenin, N ⁷ -metilguanin dan O ⁶ -metilguanin pada fase gerak amonium fosfat dengan konsentrasi 50 mM.....	71
4.3	Data waktu retensi (t _R), jumlah lempeng teoritis (N), HETP dan resolusi (R) kromatogram campuran guanin, adenin, N ⁷ -metilguanin dan O ⁶ -metilguanin pada fase gerak amonium fosfat dengan konsentrasi 40 mM.....	71
4.4	Hasil pengukuran uji kesesuaian sistem N ⁷ -metilguanin.....	72
4.5	Hasil pengukuran uji kesesuaian sistem O ⁶ -metilguanin.....	72
4.6	Hasil pengukuran resolusi (R) kromatogram campuran guanin (1), adenin (2), N ⁷ -metilguanin(3), O ⁶ -metilguanin (4), dan untuk uji kesesuaian sistem.....	73
4.7	Hasil pengukuran kurva kalibrasi N ⁷ -metilguanin.....	74
4.8	Hasil pengukuran kurva kalibrasi O ⁶ -metilguanin.....	74
4.9	Hasil pengukuran linearitas N ⁷ -metilguanin.....	75
4.10	Hasil pengukuran linearitas O ⁶ -metilguanin.....	77
4.11	Hasil pengukuran batas deteksi dan batas kuantitasi N ⁷ -metilguanin secara statistika.....	79
4.12	Hasil pengukuran batas deteksi dan batas kuantitasi O ⁶ -metilguanin secara statistika.....	80
4.13	Hasil pengukuran ketepatan (akurasi) dan keseksamaan (presisi) N ⁷ -metilguanin.....	81
4.14	Hasil pengukuran ketepatan (akurasi) dan keseksamaan (presisi) O ⁶ -metilguanin.....	82
4.15	Uji Stabilitas N ⁷ -metilguanin.....	83
4.16	Uji Stabilitas O ⁶ -metilguanin.....	83
4.17	Data zat yang terdeteksi dari sampel darah tikus hasil orientasi.....	84
4.18	Data zat yang terdeteksi dari sampel darah tikus hasil uji.....	85

DAFTAR LAMPIRAN

Lampiran	Halaman
3.1 Sertifikat analisis guanin.....	87
3.2 Sertifikat analisis adenin.....	88
3.3 Sertifikat analisis N ⁷ -metilguanin.....	89
3.4 Sertifikat analisis O ⁶ -metilguanin.....	90
3.5 Sertifikat analisis nitrosodimetilamin.....	91
3.6 Sertifikat analisis natrium nitrit.....	92
3.7 Sertifikat analisis dimetilamin.....	93
4.1 Cara perhitungan resolusi.....	94
4.2 Cara perhitungan jumlah lempeng teoritis (N) dan HETP.....	95
4.3 Cara perhitungan simpangan baku dan koefisien variasi.....	96
4.4 Cara perhitungan persamaan garis linear (linearitas).....	97
4.5 Cara perhitungan batas deteksi dan batas kuantitasi.....	98
4.6 Cara perhitungan ketepatan (akurasi).....	99
4.7 Perhitungan dosis nitrosodimetilamin untuk reaksi <i>in vitro</i>	100
4.8 Perhitungan dosis NaNO ₂ dan dimetilamin untuk tikus.....	101

BAB 1

PENDAHULUAN

1.1 Latar Belakang

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

Nitrosamin dapat terbentuk secara *in vitro* (dalam bahan makanan), maupun secara *in vivo* (dalam tubuh manusia) dan pembentukan secara *in vivo* lebih berperan dalam menimbulkan gangguan kesehatan. Pembentukan nitrosamin secara *in vivo* ini dapat terjadi melalui reaksi nitrit atau nitrat dengan amin primer, sekunder, dan tersier dalam kandungan makanan ataupun dalam organ manusia yang tidak terpapar senyawa ini (Rostkowska, Zwierz, Rozanski, Moniuszko-Jakoniuk, & Roszczenko, 1998). Dari 300 senyawa yang diuji, 90% dari senyawa nitrosamin ditemukan memiliki efek karsinogenik pada hewan uji. Sebagai contoh, nitrosodimetilamin dapat menyebabkan kanker hati, ginjal, dan paru – paru pada hewan uji (Boysen, Pachkowski, Nakamura, & Swenberg, 2009).

Potensi karsinogen senyawa nitrosamin juga bervariasi dan dapat menginduksi tumor pada beberapa spesies hewan di berbagai tempat (Liteplo, Meek, & Windle, 2002). Nitrosodimetilamin dan nitrosodietilamin merupakan karsinogen kuat, sedangkan nitrosodietanolamin dan nitrososarkosin merupakan karsinogen lemah. Senyawa nitrosamin tertentu dapat menimbulkan keganasan hanya setelah satu dosis, bahkan ada yang dapat menembus plasenta dan menimbulkan keganasan pada janin (Rostkowska, Zwierz, Rozanski, Moniuszko-Jakoniuk, & Roszczenko, 1998).

Beberapa studi pada manusia menemukan hubungan antara kanker lambung serta keabnormalan pada hati akibat pengkonsumsian senyawa nitrosodimetilamin (Liteplo, Meek, & Windle, 2002). Salah satu studi kohort yang dilakukan pada wanita, di mana terdapat risiko kanker kandung kemih yang mempunyai hubungan yang positif dengan mengkonsumsi nitrat dalam air minum. Karena studi yang telah dilakukan ini, IARC (*International Agency for Research on Cancer*) akhirnya menyimpulkan bahwa ambilan nitrat dan nitrit yang dapat menyebabkan nitrosasi secara endogen termasuk grup 2A (mungkin karsinogen pada manusia) (International Agency for Research on Cancer, 2006).

Pada penelitian sebelumnya mengenai pengaruh pemberian vitamin C terhadap pembentukan nitrosodimetilamin setelah pemberian natrium nitrit dan dimetilamin ditemukan bahwa pemberian prekursor (natrium nitrit dan dimetilamin) sebanyak setengah kali LD_{50} dapat membentuk nitrosodimetilamin dengan kadar 2,325 ppm (Putri, 2009). Penelitian terdahulu lainnya telah menemukan *adduct* yang berkaitan dengan proses karsinogenesis. *Adduct* ini merupakan biomarker kerusakan DNA yang mungkin dapat menyebabkan kanker di kemudian hari. *Adduct* DNA yang terbentuk dari paparan nitrosodimetilamin diantaranya adalah N^7 -metilguanin (70% dari semua *adduct*), O^6 -metilguanin (7%) dan *adduct* lain dalam jumlah kecil yang diantaranya adalah N^3 -metiladenin (3%) dan O^4 -metiltimin (Souliotis, 2002).

Metode-metode yang telah digunakan untuk mendeteksi adanya *adduct* antara lain: Kromatografi Cair Kinerja Tinggi (KCKT), pelabelan dengan unsur radioaktif, spektrofotometri, dan ELISA (*Enzyme-linked Immunosorbent Assay*). Kromatografi cair kinerja tinggi merupakan metode yang sesuai untuk

menganalisis komponen-komponen asam nukleat dan derivatnya dalam sampel biologi (Natalia, 2009).

Adanya penelitian mengenai pemberian prekursor yang dapat membentuk nitrosodimetilamin dan adanya *adduct* yang terbentuk akibat paparan nitrosodimetilamin mendasari dilakukannya penelitian ini yaitu mengenai pembentukan *adduct* DNA setelah pemberian natrium nitrit dan dimetilamin secara berulang pada tikus. Pada penelitian ini, analisis *adduct* yaitu N⁷-metilguanin dan O⁶-metilguanin dilakukan secara Kromatografi Cair Kinerja Tinggi (KCKT) penukar kation kuat dengan detektor fluoresensi.

1.2 Tujuan Penelitian

1.2.1 Memperoleh kondisi analisis optimum untuk analisis N⁷-metilguanin dan O⁶-metilguanin menggunakan kromatografi cair kinerja tinggi dengan detektor fluoresensi

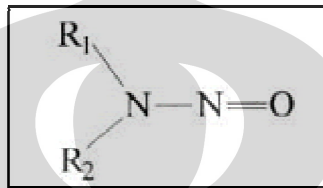
1.2.2 Melakukan deteksi dan kuantitasi *adduct* yang terbentuk setelah pemberian natrium nitrit dan dimetilamin berulang pada tikus.

BAB 2

TINJAUAN PUSTAKA

2.1 Nitrosamin

Nitrosamin adalah senyawa yang memiliki struktur umum seperti di bawah ini :



[Sumber :Rostkowska, Zwierz, Rozanski, Moniuszko-Jakoniuk & Roszczenko, 1998]

Gambar 2.1 Rumus struktur nitrosamin

di mana R₁ dan R₂ adalah grup alkil atau aril.

Nitrosamin terbentuk dari reaksi substitusi elektrofilik dari nitrogen organik dengan senyawa penitrosasi. Pada senyawa amin, kation nitrosonium (NO⁺) terbentuk dari nitrogen trioksida (N₂O₃) yang menyerang sepasang elektron pada nitrogen yang terdapat pada amin, menghasilkan kation nitrosoamonium dan anion nitrit (Rostkowska, Zwierz, Rozanski, Moniuszko-Jakoniuk, & Roszczenko, 1998). Pembentukan nitrosoamonium bergantung pada pH lingkungan, kebasaaan amin, suhu, kondisi penyimpanan, serta adanya katalisator atau inhibitor (Moller, 1989). Amin aromatik dan alifatik primer pada pH dan suhu yang rendah tidak dapat membentuk senyawa nitroso di mana reaksi dengan nitrit akan menghasilkan garam diazonium. Kecepatan reaksi senyawa N-nitroso dari amin sekunder akan meningkat dengan penurunan kebasaaan amin. Amin alifatik tersier tidak bereaksi dengan N₂O₃ dalam asam kuat (Rostkowska, Zwierz, Rozanski, Moniuszko-Jakoniuk, & Roszczenko, 1998).

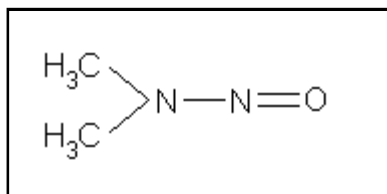
Dari sebuah penelitian di Denmark, tiosianat adalah katalis yang kuat dalam proses nitrosasi amin. Tiosianat adalah senyawa normal yang terdapat dalam saliva manusia. Tiosianat dapat mengkatalis proses nitrosasi karena tiosianat dan nitrat akan berkompetisi dalam transpor aktif dan resirkulasi nitrat di dalam saliva (Moller, 1989). Selain itu, inhibitor juga akan mempengaruhi proses nitrosasi. Beberapa zat kimia yang dapat bersifat inhibitor adalah senyawa yang mengandung fenol seperti asam kafeat (Stoner, Morse, & Kelloff, 1997), antioksidan seperti vitamin C, vitamin E, dan antioksidan lainnya.

Di dalam hati, nitrosamin oleh enzim mikrosom hati akan mengalami metabolisme fase pertama dan kedua menjadi senyawa nitroso. Tujuan utama dari kedua fase adalah meningkatkan kelarutan dalam air sehingga mudah untuk diekskresi. Pada fase pertama, hidroksilasi dan dealkilasi adalah proses utama. Pada fase kedua, produk dari fase pertama akan mengalami transformasi menjadi metabolit polar dengan aksi enzim yang spesifik yaitu konjugasi dengan asam sulfat, glukuronida atau glutation. Nitrosamin diekresikan secara parsial di urin dan sebagian melalui pernapasan. Nitrosamin yang tersisa akan didegradasi menjadi karbondioksida dan intermediet aktif. Senyawa yang dapat bersifat karsinogenik adalah intermediet aktif (Rostkowska, Zwierz, Rozanski, Moniuszko-Jakoniuk, & Roszczenko, 1998).

2.2 Nitrosodimetilamin (NDMA)

Nitrosodimetilamin adalah dialkilnitrosamin yang paling sederhana dan dapat terbentuk di udara, air dan tanah sebagai proses biologis dan proses kimia (Liteplo, Meek, & Windle, 2002). Senyawa ini tergolong nitrosamin yang mudah menguap seperti Nitrosopiperidin dan Nitrosopirolidin yang sering ditemukan pada makanan (Domanska & Kowalski, 2002).

Nitrosodimetilamin memiliki rumus molekul $C_2H_6N_2O$ dengan berat molekul 74,68. Rumus struktur terlihat seperti di bawah ini :



[Sumber : Liteplo, Meek, &Windle, 2002]

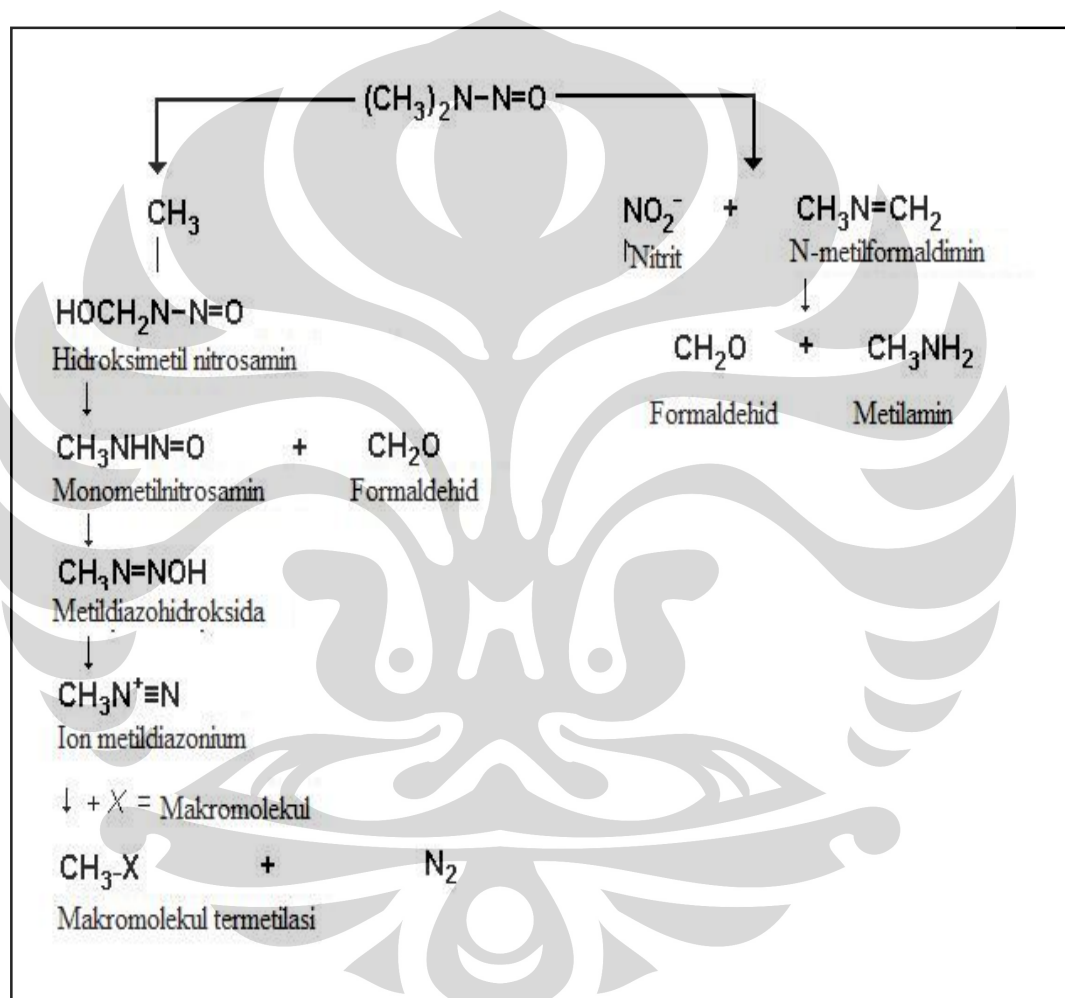
Gambar 2.2. Struktur kimia dari nitrosodimetilamin

Pada suatu studi kohort yang dilakukan, ambilan nitrit, nitrat dan nitrosodimetilamin tergolong cukup tinggi pada makanan. Pengambilan sehari – hari nitrat paling banyak berasal dari sayuran (92%), nitrit paling banyak berasal dari *cured meat* dan *sausages* (94%), sedangkan nitrosodimetilamin dari makanan yang banyak berasal dari pengasapan dan ikan asin (52%) serta dari *cured meat* dan *sausages* (48%) (Speijers & Van den Brandt, 2009). Seperti yang diketahui sebelumnya, nitrosodimetilamin juga dapat terjadi secara internal di lambung. Sekitar 25% nitrat yang dikonsumsi mengalami resirkulasi ke kelenjar saliva. Bakteri di mulut dan usus dapat mereduksi nitrat menjadi nitrit yang kemudian dapat bereaksi dengan amin membentuk nitrosamin secara spontan (Abnet, 2007).

Kanker dapat terjadi sebagai akibat akumulasi paparan nitrosodimetilamin. Dosis tumorigenik terendah untuk perkembangan tumor hepar pada tikus jantan dan betina yang terpapar nitrosodimetilamin adalah 34 µg per kilogram berat badan perhari. Informasi yang berkaitan dengan penilaian karsinogenisitas nitrosodimetilamin berhubungan dengan percobaan menggunakan hewan percobaan dan data – data yang berkaitan dengan genotoksisitas, metabolisme dan interaksi dengan makromolekul biologis (Liteplo, Meek, & Windle, 2002).

Aktivasi metabolit dari nitrosodimetilamin terjadi dengan proses hidroksilasi atau denitrosasi nitrosamin. Kedua jalur proses ini akan melalui radikal intermediet ($\text{CH}_3\text{CH}_2\text{N-N=O}$) yang disebabkan oleh kerja sitokrom P450 (CYP2E1). Setelah mengalami hidroksilasi, maka akan terbentuk hidroksimetilnitrosamin ($\text{HOCH}_2\text{CH}_3\text{N-N=O}$) yang kemudian membentuk intermediet radikal yang akan terurai menjadi formaldehida (terurai menjadi karbondioksida) dan monometilnitrosamin ($\text{CH}_3\text{NHN=O}$). Monometilnitrosamin merupakan senyawa yang tidak stabil, sehingga akan terjadi penyusunan kembali

membentuk ion metildiazonium sebagai agen metilating yang kuat ($\text{CH}_3\text{N}^+\text{N}$) yang dapat mengalkilasi makromolekul seperti DNA, RNA, dan protein. Perubahan metabolit pada radikal intermediet dengan denitrosasi akan membentuk metilamin (CH_3NH_2) dan formaldehida merupakan jalur detoksifikasi (World Health Organization, 2008).



[Sumber : Liteplo, Meek, & Windle, 2002] (telah diolah kembali)

Gambar 2.3. Metabolisme nitrosodimetilamin

Ada bukti yang kuat mengenai efek toksik dari nitrosodimetilamin yaitu secara langsung bergantung pada CYP2E1 yang mengubah nitrosamin menjadi spesi reaktif yang tinggi. Hepatoksitas dari nitrosodimetilamin berasal dari

pembentukan ion metildiazonium dengan jalur alfa hidroksilasi, sedangkan denitrosasi memiliki kontribusi yang kecil dalam efek hepatotoksik pada tikus. *Adduct* DNA yang dibentuk dari paparan NDMA adalah N⁷-metilguanin (70% dari semua *adduct*) (Souliotis, 2002), O⁶-metilguanin (7%) dan *adduct* lain dalam jumlah kecil yang diantaranya adalah N³-metiladenin (3%) (Liteplo, Meek, & Windle, 2002), N⁷-metiladenin, N²-metilguanin, N³-metilguanin, O²-metiltimin, O⁴-metiltimin (<0,1%) (Liteplo, Meek, & Windle, 2002), dan O²-metilsitosin. Diantara *adduct* tersebut, alkilasi pada N⁷-guanin memberikan biomarker yang baik untuk menentukan paparan dari agen-agen alkilating karena reaksi alkilasi tersebut lambat diperbaiki oleh DNA glikosilase (Chao, Chang, Wong, & Hu, 2009).

O⁶-metilguanin (*adduct* yang terbentuk 10x lebih lambat dari N⁷-metilguanin) dan O⁴-metiltimin (terbentuk sekitar 1% dari jumlah O⁶-metilguanin) adalah promutagenik yang kuat dengan mekanisme *mismatch direct*. O⁶-metilguanin menyebabkan transisi G:C menjadi A:T, sedangkan O⁴-metiltimin menyebabkan transisi A:T menjadi G:C (Liteplo, Meek, & Windle, 2002). Mutasi ini dan mutasi lainnya dapat mengaktifkan onkogen seperti KRAS atau menginaktifkan gen penekan tumor seperti p53 (International Agency for Research on Cancer, 2004).

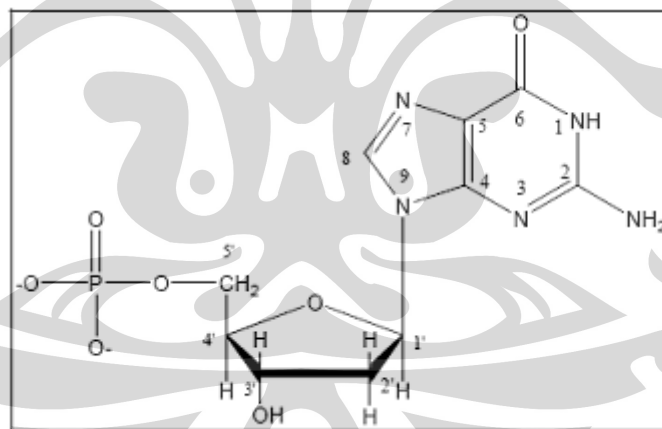
Kemampuan sel untuk memperbaiki DNA (dengan melepaskan metil dari O⁶-metilguanin) melalui aksi spesifik O⁶-metilguanin DNA metil transferase sebelum pembelahan sel memegang peranan penting dalam menentukan kerentanan jaringan terhadap perkembangan tumor. Ada perbedaan terkait spesies dan umur pada O⁶-metilguanin hepar, yang berhubungan dengan variasi aktivitas dari DNA metil transferase. Hal ini menyangkut aktivitas hepatic yang lebih besar pada dewasa dibanding mencit yang baru lahir, pada tikus dibanding mencit dan pada mencit juga berbeda-beda (Liteplo, Meek, & Windle, 2002).

Pada penelitian yang melakukan pemaparan nitrosodimetilamin terhadap tikus (0,2 – 2,64 ppm dalam air minum) selama 180 hari menghasilkan akumulasi yang cepat pada N⁷-metilguanin dan O⁶-metilguanin pada hati dan sel darah putih. Kadar *adduct* maksimum dicapai selama 1 – 7 hari dan bergantung pada dosis

yang diberikan. Kadar dari kedua *adduct* tersebut konstan hingga hari ke-28, setelah itu akan turun perlahan sekitar 40% dari kadar maksimum di hati dan 60% untuk sel darah putih pada hari ke-180 (Souliotis, 2002).

2.3 Asam Nukleat

Asam nukleat merupakan gabungan dari nukleotida-nukleotida, sehingga disebut sebagai polinukleotida. Tiap nukleotida terdiri dari basa nitrogen, gula pentosa, dan satu atau lebih grup fosfat (Black, 1999). Pada suatu nukleotida, atom karbon 1' dari gula akan berikatan dengan gugus nitrogen pada posisi sembilan dari basa purin atau pada posisi satu dari basa pirimidin, atom karbon 5' dari gula akan berikatan dengan gugus fosfat. Nukleotida akan berikatan dengan nukleotida lainnya melalui ikatan fosfodiester yang terbentuk dari ikatan antara gugus fosfat dari satu nukleotida dengan gugus hidroksil pada atom karbon 3' dari gugus gula nukleotida lainnya.

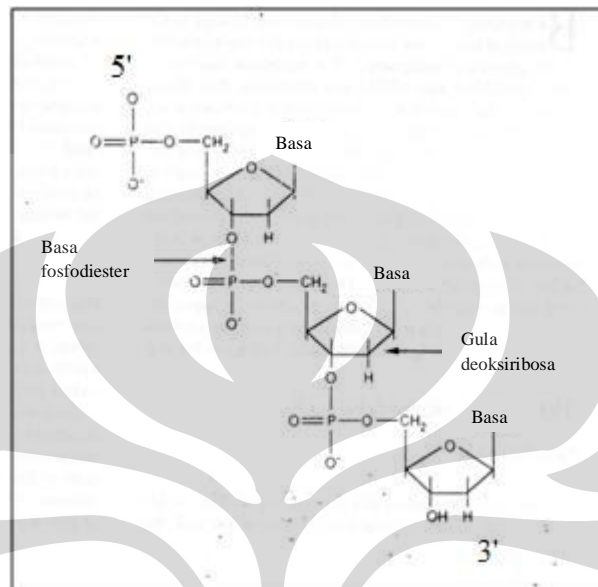


[Sumber : Harvey, L., et al., 1995]

Gambar 2.4. Struktur kimia nukleotida penyusun asam nukleat

Ada dua macam asam nukleat, yaitu asam deoksiribonukleat atau *deoxyribonucleic acid* (DNA) dan asam ribonukleat atau *ribonucleic acid* (RNA). DNA terdiri dari nukleotida yang merupakan pasangan basa purin atau pirimidin ditambah gugus gula dan grup fosfat. Nukleotida saling berikatan dengan ikatan fosfodiester di antara gula dan grup fosfat yang membentuk polimer sebagai

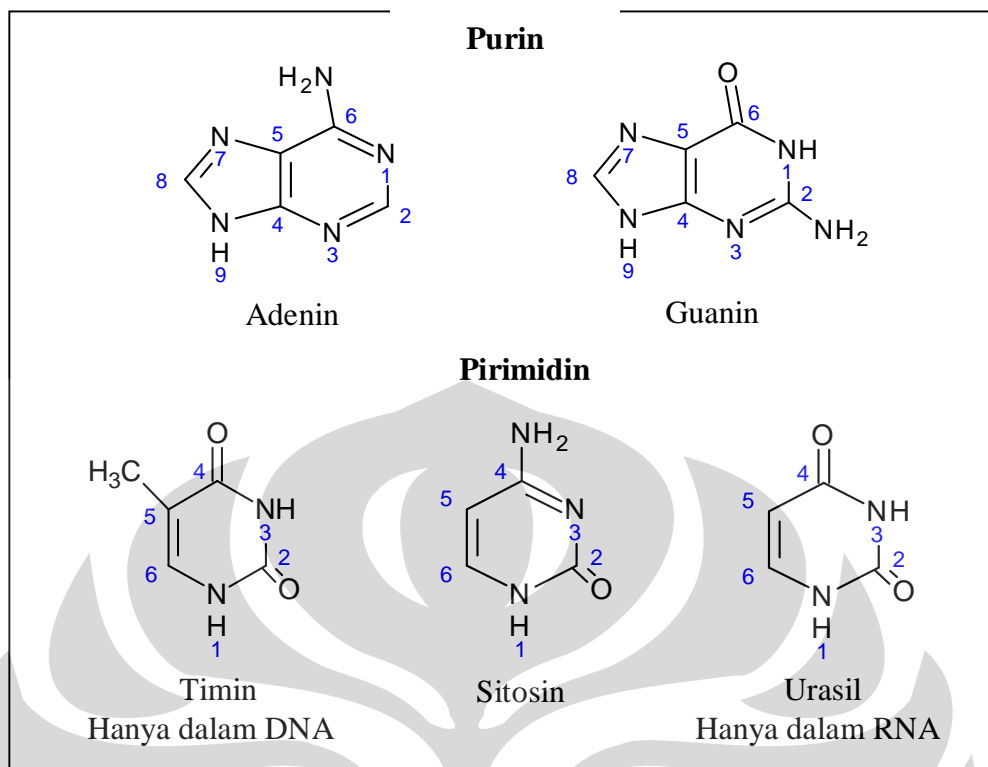
backbone molekul DNA. DNA terdiri dari 2 rantai polimer nukleotida yang berpegangan bersama – sama dengan ikatan hidrogen dalam konfigurasi *doublehelix*.



[Sumber : Hoff, D. Y. & Van, D. D. 1993]

Gambar 2.5. Struktur DNA

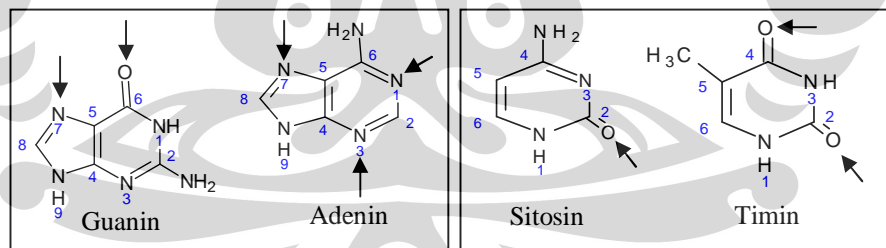
Informasi genetik DNA biasanya ditranslasikan menjadi protein lalu dikeluarkan dari nukleus ke sitoplasma yang kemudian diartikan dengan kode genetik. Biomolekul yang berperan dalam hal ini adalah RNA. RNA berbeda dengan DNA dalam hal *backbone* gula, di mana RNA mengandung grup hidroksil pada posisi kedua ribosa, sedangkan DNA mengandung atom hidrogen (Hoff & Van, 1993). Ada tiga jenis basa nitrogen yaitu adenin, sitosin dan guanin yang ditemukan baik pada DNA maupun RNA. Hal lain yang membedakan adalah DNA mengandung basa timin dan RNA mengandung basa urasil. Adenin dan guanin adalah derivat purin yaitu molekul basa nitrogen yang mengandung struktur *double ring*. Sedangkan timin, sitosin dan urasil adalah pirimidin yaitu molekul basa nitrogen yang mengandung struktur *single ring* (Black, 1999).



[Sumber : Black, J. G., 1999] (telah diolah kembali)

Gambar 2.6. Basa nitrogen yang ditemukan dalam asam nukleat

Berikut adalah posisi penyerangan DNA oleh zat karsinogenik:



Gambar 2.7 Struktur kimia basa-basa purin dan pirimidin serta posisi penyerangan DNA oleh zat karsinogen

2.4 Adduct

Adduct adalah senyawa kovalen yang berasal dari modifikasi terhadap basa DNA atau asam amino yang bersifat nukleofil oleh senyawa toksik yang bersifat elektrofil (Sari, 2008). Penelitian terdahulu telah membuktikan bahwa terdapat hubungan antara pembentukan *adduct* dan mutagenesis, di mana

penekanan jumlah *adduct* DNA bermanfaat untuk pencegahan kanker (Poirer, Santella, & Weston, 2000). *Adduct* berpotensi untuk menjadi biomarker dari peristiwa karsinogenesis sehingga diharapkan agar deteksi sensitif biomarker ini dapat menghasilkan deteksi dini karsinogenesis (Poirier & Beland, 1994).

Sebuah studi menunjukkan 157 dari 175 senyawa yang diketahui karsinogen juga merupakan mutagen. Perkembangan kanker (karsinogenesis) melibatkan akumulasi mutasi dalam gen. Mutasi ini dapat sebagai hasil replikasi DNA yang tidak sempurna/ proses perbaikan, kerusakan oksidatif DNA, dan atau kerusakan DNA yang disebabkan karsinogen lingkungan. Beberapa karsinogen kimia dapat mengubah DNA melalui interaksi kovalen (*adduct* DNA) atau kerusakan oksidatif DNA baik secara langsung maupun tidak langsung. Pada tahun 1950an, James Miller dan Elizabet berhipotesis bahwa beberapa karsinogen secara metabolit dapat teraktivasi, metabolit tersebut bersifat elektrofilik dan berikatan dengan sisi nukleofilik dari DNA (Smart, 2004).

Dari konsep aktivasi ini, maka senyawa karsinogen yang merupakan penyebab timbulnya *adduct* dapat dibedakan menjadi dua golongan, yakni yang bekerja langsung (*directly-acting agents*) dan yang bekerja secara tidak langsung (*indirectly-acting agents*). Senyawa karsinogen yang bekerja langsung akan bereaksi langsung dengan DNA dan membentuk *adduct* DNA jika berada dalam tubuh, sedangkan senyawa karsinogen yang bekerja secara tidak langsung membutuhkan aktivasi metabolik terlebih dahulu di dalam tubuh dengan bantuan sistem enzim yang terutama berada di retikulum endoplasma untuk dapat bereaksi dengan DNA (Venitt & Parry, 1984).

Pembentukan *adduct* DNA melibatkan beberapa basa, di mana posisi N⁷-guanin adalah salah satu sisi nukleofilik yang paling besar pada DNA. Pembentukan *adduct* memiliki kecenderungan yang berbeda-beda dalam menyebabkan mutasi yang bergantung pada kekompleksan dari gugus alkil yang terikat. Semakin kompleks gugus yang terikat, maka semakin besar kecenderungan *adduct* tersebut untuk menyebabkan mutasi karena pembentukan ikatan kompleks ke dalam DNA akan menyebabkan perubahan yang nyata dalam struktur DNA (Venitt & Parry, 1984).

2.5 Kromatografi Cair Kinerja Tinggi (KCKT)

2.5.1 Teori KCKT

Kromatografi adalah metode analitik yang digunakan secara luas untuk pemisahan, identifikasi, dan penentuan komponen kimia dalam campuran kompleks. Metode kromatografi terdiri dari dua tipe yaitu kolom kromatografi dan kromatografi planar. Kolom kromatografi merupakan kromatografi di mana fase stasioner terdapat dalam tube sempit dan fase gerak dipaksa melalui tube dengan tekanan atau gravitasi. Kromatografi planar adalah kromatografi di mana fase diam didukung oleh piringan datar atau kertas yang berpori dan fase gerak bergerak melalui fase diam dengan aksi kapiler atau pengaruh gravitasi (Skoog, 1991).

Kromatografi cair kinerja tinggi (KCKT) merupakan tipe kromatografi yang menggunakan fase gerak berupa zat cair dan fase diam berupa zat padat (Skoog, 1991). Beberapa keuntungan KCKT adalah waktu analisis cepat, daya pisahnya baik, peka, pemilihan kolom dan eluen sangat bervariasi, kolom dapat dipakai kembali, dapat digunakan untuk molekul besar dan kecil, mudah untuk memperoleh kembali cuplikan, dan dapat menghitung sampel dengan kadar yang sangat rendah (Harmita, 2006).

2.5.2 Jenis KCKT

Ada empat tipe KCKT yang secara luas digunakan, di antaranya adalah :

2.5.2.1 Partisi atau Kromatografi Cair – Cair

Kromatografi partisi merupakan kromatografi yang didasarkan pada partisi linarut antara dua pelarut yang saling tidak bercampur, salah satunya fase diam dan yang lainnya adalah fase gerak. Jika fase gerak bersifat polar dan fase diam bersifat nonpolar, kromatografi ini dikenal sebagai kromatografi fase balik, dan jika fase gerak bersifat nonpolar dan fase diam polar, kromatografi ini dikenal sebagai kromatografi fase normal (Johnson & Stevenson, 1991).

2.5.2.2 Adsorpsi atau Kromatografi Cair-Padat

Kromatografi adsorpsi merupakan metode pemisahan berdasarkan adsorpsi zat terlarut oleh bahan penjerap dalam fase diam, dengan penambahan fase gerak lebih lanjut, masing-masing zat terlarut akan bergerak dengan kecepatan tertentu, sehingga terjadi pemisahan (Harahap, Hayun, & Irawati, 2008).

2.5.2.3 Kromatografi Eklusi

Kromatografi eklusi merupakan metode pemisahan berdasarkan ukuran molekul linarut. Walaupun bobot molekul sama tetapi bila garis tengah efektifnya berbeda maka komponen dengan garis tengah efektif yang lebih besar akan terelusi terlebih dahulu. Hal ini disebabkan karena senyawa yang memiliki garis tengah lebih kecil akan lebih mudah masuk ke dalam pori-pori fase diam dan terelusi lebih lama (Harmita, 2006).

2.5.2.4 Kromatografi Pertukaran Ion

Kromatografi ion merupakan kromatografi cair yang menggunakan resin penukar ion untuk memisahkan ion-ion berdasarkan interaksinya dengan resin (Gandjar & Rohman, 2007).

Mekanisme proses pertukaran ion dapat digambarkan sebagai berikut, fase diam mengandung gugus fungsi yang bermuatan ion tetap. Selain itu, terdapat ion lawan yang dapat ditukar di dekatnya, agar muatan netral. Ion cuplikan (sampel) dapat bertukar dengan ion lawan dan menjadi pasangan ion muatan tetap. Jika ion cuplikan berpasangan dengan ion muatan tetap, ion tersebut tidak keluar dari kolom. Afinitas berbagai senyawa terhadap ion muatan tetap berbeda sehingga dapat memisahkan campuran senyawa ion (Johnson & Stevenson, 1991).

Pada penelitian ini, digunakan metode kromatografi dengan penukar kation karena basa nukleotida adalah senyawa bersifat basa lemah yang dapat terprotonasi dalam suasana asam (pH 3,00) menghasilkan senyawa bermuatan positif, sehingga dapat berkompetisi dengan ion lawan (eluen), dimana pada penelitian ini digunakan dapar ammonium, ion NH_4^+ , untuk berinteraksi dengan ion tetap, resin penukar kation kuat berupa gugus asam sulfonat, sehingga terjadi

pemisahan dalam kolom, dan dapat dideteksi dan dianalisis dengan detektor yang selektif.

Hal – hal yang perlu diperhatikan pada kromatografi penukar ion adalah (Skoog, 1991) :

1. Pemilihan kemasan kolom

Banyak ahli kromatografi pertama-tama akan memilih kemasan kolom yang berpenyangga silika. Alasannya karena kemasan kolom ini biasanya menghasilkan sejumlah pelat teori yang besar dan sangat selektif, terutama untuk senyawa isomer. Akan tetapi, kemasan ini kurang bagus pada daerah pH di luar pH 2,5-7. Jika dapar atau sampel memerlukan pH di luar rentang itu, harus dipilih kemasan kolom berpenyangga polistirena. Pemakaian kromatografi pasangan ion sebagai alternatif terakhir kecuali jika sampel mengandung komponen berupa ion dan non-ion.

2. Pemilihan dapar

Umumnya dapar yang dipilih adalah garam dapar yang mempunyai gugus fungsi yang serupa dengan gugus fungsi yang terdapat di dalam sampel. Contoh, pakailah anion asetat sebagai dapar untuk mengelusi asam organik atau dihidrogen fosfat untuk mengelusi nukleotida, yaitu organofosfat. Karena sampel dan ion dapar mempunyai afinitas yang sebanding terhadap resin/damar, keseimbangan bersaing mudah dipertahankan dan sedikit perbedaan dalam membuat dapar akan kecil pengaruhnya pada pemisahan.

Pertimbangan lain adalah kemurnian garam dapar, terutama jika pemisahan melibatkan elusi landaian dengan tanggapan sampel kecil. Dapar harus dipilih yang tidak terdeteksi dengan detektor yang akan dipakai. Karena sifat air yang unggul dalam melarutkan dan mengionkan, sebagian besar kromatografi pertukaran ion dilakukan dalam larutan air. Dapar dalam air berperan dalam menyediakan ion lawan untuk kesetimbangan ion dan untuk menjaga kekuatan ion dan pH fase gerak. Pelarut organik, seperti metanol atau etanol, kadang-kadang

dicampur dengan larutan dapar dalam air agar keselektifannya unik dan untuk memperbaiki kelarutan sampel. Tetapi harus diingat supaya konsentrasi pelarut organik ini tidak terlalu besar agar tidak terjadi endapan garam dapar. Hal ini hampir selalu menimbulkan masalah, seperti bocor pada pompa dan perapat atau terjadi penyumbatan kolom.

Konsentrasi dapar mempengaruhi kesetimbangan pertukaran ion. Untuk sistem dapar tertentu, batas atas kekuatan dapar adalah kelarutan garam dapar dalam fase gerak. Batas bawah kekuatan dapar dipengaruhi oleh kapasitas dapar. Jika dapar terlalu lemah, ia tidak dapat mengendalikan pH fase gerak. Jika konsentrasi dapar naik, viskositas pelarut naik pula. Konsentrasi dapar yang hampir jenuh harus dihindari karena perubahan suhu sedikit saja dapat menyebabkan pengendapan garam dan dapat menimbulkan penyumbatan dalam sistem kolom.

Teori pertukaran ion memberikan pemahaman yang berguna mengenai bagaimana konsentrasi dapar mempengaruhi kromatografi. Pertukaran ion adalah proses bersaing. Menaikkan konsentrasi ion lawan akan menurunkan kemampuan ion sampel untuk bersaing mencapai titik pertukaran dan tidak akan tertahan dalam kolom. Jadi menaikkan konsentrasi dapar mengakibatkan penurunan waktu tambat. Konsentrasi dapar harus disesuaikan untuk mengendalikan pemisahan.

Di samping pengaruh pada kekuatan ion, pH dapar mempengaruhi kesetimbangan ion beberapa damar/resin. pH fase gerak sangat berpengaruh pada pengionan damar/resin penukar ion yang bersifat asam lemah dan yang bersifat basa lemah. Untuk penukar ion yang bersifat asam lemah, penurunan pH (peningkatan konsentrasi ion hidrogen) menyebabkan penurunan pengionan gugus aktif pada permukaan. Jumlah linarut yang diserap oleh damar/resin beragam, bergantung pada pH fase gerak. Misalnya, jika titik penukar penukar anion menurun karena keasaman dapar meningkat, peluang pembentukan pasangan ion linarut-damar menurun. Penurunan dalam pembentukan pasangan ion tersebut akan menurunkan waktu tambat. Penukar anion dan kation kuat hanya dipengaruhi sedikit saja oleh perubahan pH fase gerak.

3. Pengaruh suhu

Naiknya suhu menyebabkan ionisasi bertambah. Hal ini menyebabkan perubahan waktu retensi yang tergantung pada perubahan derajat ionisasi fase gerak dan analit dimana konsentrasi keduanya merupakan suatu fungsi terhadap waktu retensi analit.

2.5.3 Instrumentasi KCKT

2.5.3.1 Reservoir Eluen

Reservoir eluen berfungsi untuk menampung eluen, umumnya dengan kapasitas 500 mL atau lebih.

2.5.3.2 Pompa (Skoog, 1991)

Pompa berfungsi untuk mengalirkan eluen ke dalam kolom.

2.5.3.3 Injektor (Skoog, 1991)

Injektor berfungsi untuk menyuntikan analit ke dalam kolom.

2.5.3.4 Kolom

Kolom berfungsi untuk proses pemisahan analit dalam sampel. Kolom dapat dibagi menjadi dua kelompok yaitu kolom analitik dan kolom preparatif (Johnson & Stevenson, 1991). KCKT sering ditambahkan suatu kolom penyangga sebelum kolom analitik untuk memperpanjang umur dari kolom analitik yang disebut *guard* kolom. *Guard* kolom bertindak sebagai penyaring kimia yang menahan material yang mungkin dapat merusak atau menyumbat kolom yang berefek pada pemendekan umur kolom. Dengan panjang 1-5 cm dan berisikan fase diam yang mirip dengan kolom, *guard kolom* diletakkan di antara injektor dan kolom (Harmita, 2006).

2.5.3.5 Detektor

Detektor berfungsi untuk menganalisis, mengidentifikasi, dan mendeteksi analit dalam sampel setelah dielusi dan mengukur kadarnya (Harmita, 2006).

Macam-macam detektor yang dapat digunakan:

1. Detektor serapan optik (Harmita, 2006)

Detektor ini digunakan untuk mendeteksi komponen zat yang menyerap cahaya di daerah ultraviolet (190-400 nm), cahaya tampak (400-700 nm), dan infra red (2-35 nm). Keuntungan yang diperoleh dari detektor ini adalah pemilihan panjang gelombang yang luas dan sensitivitas terhadap analit yang baik. Detektor serapan uv bersifat selektif yaitu untuk senyawa – senyawa yang memiliki gugus kromofor.

2. Detektor elektrokimia (Harmita, 2006)

Pendeteksian tergantung sifat hantaran molekul zat terlarut. Deteksi dimungkinkan apabila terjadi transfer secara reversibel oleh suatu zat melalui gugus fungsional tertentu. Aplikasi terbaik adalah saat digunakan fase gerak yang bersifat polar.

3. Detektor ionisasi nyala (Harmita, 2006)

Pelarut diuapkan setelah melewati kolom, kemudian dilewatkan pada sumber lampu ultraviolet dan dideteksi nyala.

4. Detektor penguapan penghamburan cahaya (Evaporation Light Scattering Detector) (Harmita, 2006)

Pelarut diuapkan setelah melewati kolom, komponen yang tersisa dievaporasi sebagai partikel molekul. Semua komponen dapat dideteksi dengan detektor ini sehingga kurang spesifik.

5. Detektor radioaktif (Harmita, 2006)

Detektor ini hanya dapat mendeteksi zat yang dapat memancarkan radiasi.

6. Detektor fluoresensi (Harmita, 2006)

Detektor ini hanya dapat mendeteksi komponen-komponen zat yang dapat berfluoresensi. Sensitivitas fluoresensi 10 -1000 kali lebih tinggi daripada detektor

UV untuk senyawa yang kuat mengabsorpsi sinar UV. Fluoresensi adalah peristiwa pemancaran kembali oleh molekul yang telah menyerap energi sinar yang terjadi dalam waktu yang sangat singkat setelah penyerapan (10^{-8} detik). Ketika senyawa memiliki gugus fungsional spesifik yang tereksitasi dengan energi gelombang pendek dan memancarkan radiasi gelombang panjang maka senyawa tersebut dikatakan dapat berfluoresensi. Intensitas fluoresensi bergantung pada gelombang eksitasi dan emisi, yang dapat secara selektif mendeteksi komponen (Scott, 2003).

2.5.4 Teori Kolom

2.5.4.1 Efisiensi Kolom

Efisiensi kolom menunjukkan kemampuan kolom untuk menghasilkan puncak sempit dan perbaikan pemisahan. Efisiensi kolom diketahui dengan menghitung jumlah pelat teori (N) dan panjang kolom yang sesuai dengan theoretical plate (Height Equivalent to a Theoretical Plate, HETP). HETP adalah panjang kolom yang diperlukan untuk tercapainya keseimbangan komponen sampel antara fase gerak dengan kolom. $N > 2500$ menunjukkan keadaan kromatografi yang ideal. Kolom yang baik memiliki HETP yang kecil dan N yang besar.

2.5.4.2 Resolusi (R)

Resolusi merupakan suatu ukuran apakah suatu senyawa terpisah secara baik atau tidak dengan senyawa lainnya. Resolusi didefinisikan sebagai jarak (R) antara dua puncak dibagi rata-rata lebar (W) dua puncak yang diukur pada alas puncak. Pemisahan dapat dikatakan baik apabila nilai resolusi lebih besar dari 1,5.

2.6 Validasi Metode Analisis

Validasi metode analisis adalah suatu tindakan penilaian terhadap parameter tertentu, berdasarkan percobaan laboratorium, untuk membuktikan bahwa parameter tersebut memenuhi persyaratan untuk penggunaannya (Harmita, 2006).

Metode analisis yang sensitif dan selektif untuk evaluasi obat dan metabolit (analit) secara kuantitatif adalah penting untuk studi farmakologi klinis dan biofarmasetik atau preklinis. Validasi metode bioanalisis menyangkut semua prosedur yang menunjukkan metode khusus yang digunakan untuk mengukur analit secara kuantitatif dalam matriks biologi, seperti darah, plasma, serum, atau urin yang dapat dipercaya dan dapat dilakukan kembali. Parameter validasi yang penting meliputi, akurasi, presisi, selektivitas, sensitivitas, reproduibilitas dan stabilitas (Department of Health and Human Services, 2001).

2.6.1 Kecermatan (Akurasi)

Akurasi adalah kedekatan nilai hasil pengukuran dengan nilai yang sebenarnya. Ada tiga cara untuk menentukan nilai akurasi, yakni: (1) perbandingan dengan standar analit, (2) perolehan kembali analit yang ditambahkan ke dalam matriks blanko (plasebo), (3) penambahan standar analit ke dalam matriks yang sudah terdapat analit di dalamnya.

Analit yang tidak berada dalam matriks yang kompleks dapat ditentukan nilai akurasinya dengan cara membandingkan secara langsung terhadap standar analit. Untuk mengukur akurasi dibutuhkan minimal sembilan kali pengukuran, masing-masing tiga kali dari tiga konsentrasi yang berbeda. Pendekatan cara ini akan meminimalisir perbedaan atau penyimpangan dalam mempersiapkan sampel dan analisis sampel pada satu konsentrasi. Hasil pengukuran dapat dibandingkan dengan hasil yang diperoleh dengan metode lain atau hasil yang terdapat pada sertifikat analisis.

Jika metode digunakan untuk menganalisis analit yang berada pada matriks sampel yang kompleks, pengukuran akurasi dapat dilakukan dengan uji perolehan kembali analit yang ditambahkan ke dalam matriks blanko. Standar analit ditambahkan ke dalam plasebo dengan beberapa konsentrasi berbeda. Perolehan kembali ditentukan dengan cara membandingkan dengan konsentrasi standar analit yang ditambahkan. Untuk analisis komponen utama, konsentrasi penambahan standar analit yang digunakan adalah 50, 75, 100, 125 dan 150%

dari konsentrasi analit yang diperkirakan. Tiap konsentrasi terdiri dari minimal tiga replikat.

Metode penambahan standar dilakukan dengan menambahkan standar analit yang diketahui konsentrasinya ke dalam matriks sampel yang telah mengandung analit yang belum diketahui konsentrasinya. Metode ini digunakan jika terlalu sulit untuk menyiapkan matriks blanko tanpa analit. Pada umumnya, konsentrasi penambahan standar analit yang digunakan adalah 25, 50 dan 100% dari konsentrasi analit yang diperkirakan.

2.6.2 Keseksamaan (presisi)

Keseksamaan adalah ukuran yang menunjukkan derajat kesesuaian antara hasil uji individual, diukur melalui penyebaran hasil individual dari rata-rata jika prosedur ditetapkan secara berulang pada sampel-sampel yang diambil dari campuran yang homogen.

Keseksamaan diukur sebagai simpangan baku atau simpangan baku relatif (koefisien variasi). Keseksamaan dapat dinyatakan sebagai keterulangan (*repeatability*) atau ketertiruan (*reproducibility*). Keterulangan adalah keseksamaan metode jika dilakukan berulang kali oleh analis yang sama pada kondisi sama dan dalam interval waktu yang pendek. Ketertiruan adalah keseksamaan metode jika dikerjakan pada kondisi yang berbeda. Biasanya analisis dilakukan dalam laboratorium-laboratorium yang berbeda menggunakan peralatan, pereaksi, pelarut, dan analis yang berbeda pula.

Kriteria seksama diberikan jika metode memberikan simpangan baku relatif atau koefisien variasi 2% atau kurang. Akan tetapi kriteria ini sangat fleksibel tergantung pada konsentrasi analit yang diperiksa, jumlah sampel, dan kondisi laboratorium.

Percobaan keseksamaan dilakukan terhadap paling sedikit enam replikat sampel yang diambil dari campuran sampel dengan matriks homogen. Keseksamaan sebaiknya ditentukan terhadap sampel sebenarnya yaitu berupa campuran dengan bahan pembawa sediaan farmasi (plasebo) untuk melihat pengaruh matriks pembawa terhadap keseksamaan ini. Demikian juga harus

disiapkan sampel untuk menganalisis pengaruh pengotor dan hasil degradasi terhadap keseksamaan ini.

2.6.3 Linearitas

Linearitas adalah kemampuan metode analisis yang memberikan respon secara langsung atau dengan bantuan transformasi matematik yang baik, proporsional terhadap konsentrasi analit dalam sampel.

Linearitas biasanya dinyatakan dalam istilah variansi sekitar arah garis regresi yang dihitung berdasarkan persamaan matematik data yang diperoleh dari hasil uji dalam pengujian linearitas adalah melalui persamaan garis lurus dengan metode kuadrat terkecil antara hasil analisis terhadap konsentrasi analit. Jumlah sampel yang diuji sekurang-kurangnya delapan buah sampel blanko. Sebagai parameter adanya hubungan linear digunakan koefisien korelasi r pada analisis regresi linier $y = a + bx$. Hubungan linear yang ideal dicapai dengan nilai $b = 0$, dan $r = +1$ atau -1 bergantung pada arah garis.

Sedangkan nilai a menunjukkan kepekaan analisis terutama instrumen yang digunakan. Parameter lain yang harus dihitung adalah simpangan baku residual (S_v), sehingga nantinya akan diperoleh standar deviasi fungsi regresi (S_{x_0}) dan koefisien variasi fungsi regresi (V_{x_0}), dimana $V_{x_0} \leq 2.0\%$ untuk sediaan farmasi dan $\geq 5.0\%$ untuk sediaan biologi.

2.6.4 Selektivitas

Selektivitas atau spesifisitas adalah kemampuan untuk mengukur analit yang dituju secara tepat dan spesifik dengan adanya komponen-komponen lain dalam matriks sampel seperti ketidakmurnian, produk degradasi, dan komponen matriks.

Selektivitas dibagi ke dalam 2 kategori, yakni uji identifikasi dan uji kemurnian atau pengukuran. Untuk tujuan identifikasi, selektivitas ditujukan untuk membedakan antar senyawa yang memiliki struktur mirip yang terdapat di dalam sampel. Untuk tujuan uji kemurnian dan tujuan pengukuran kadar, selektivitas ditunjukkan oleh daya pisah dua senyawa yang berdekatan. Senyawa-

senyawa tersebut biasanya adalah komponen utama atau komponen aktif dan atau suatu pengotor.

Penentuan selektivitas metode dapat diperoleh dengan 2 jalan. Pertama, dengan melakukan optimasi sehingga diperoleh senyawa yang dituju terpisah secara sempurna dari senyawa-senyawa lain (resolusi senyawa yang dituju ≥ 2). Cara kedua, dengan menggunakan detektor selektif, terutama untuk senyawa-senyawa yang terelusi secara bersama-sama.

2.6.5 Batas Deteksi dan Batas Kuantitasi (Harmita, 2006)

Batas deteksi adalah jumlah terkecil analit dalam sampel yang dapat dideteksi yang masih memberikan respon signifikan dibandingkan dengan blanko. Batas deteksi merupakan parameter uji batas. Batas kuantitasi merupakan parameter pada analisis renik dan diartikan sebagai kuantitas terkecil analit dalam sampel yang masih dapat memenuhi kriteria cermat dan seksama. Batas deteksi dan batas kuantitasi dapat dihitung secara statistik melalui garis regresi linier dari kurva kalibrasi.

2.6.6 Kesesuaian Sistem (Farmakope Indonesia edisi keempat, 1995)

Bila memakai metode kromatografi, seperti kromatografi cair kinerja tinggi atau kromatografi gas, umumnya dikehendaki adanya kepastian kesesuaian dan keefektifan sistem operasional yang digunakan. Pada hakekatnya pengujian semacam itu berdasarkan konsep bahwa elektronik, peralatan, zat uji, dan kondisi operasional analitik membentuk suatu sistem analitik tunggal yang dapat diuji fungsinya secara keseluruhan. Data spesifik dikumpulkan dari penyuntikan ulang larutan uji dan larutan baku. Data-data ini disesuaikan terhadap nilai maksimum dan minimum, seperti efisiensi, presisi, faktor ikutan, resolusi, waktu retensi, bentuk kurva kalibrasi, respon dan perolehan kembali, seperti yang tertera pada masing-masing monografi.

2.7 Metode Lain yang Digunakan untuk Analisis *Adduct* DNA

2.7.1 Kromatografi Cair Kinerja Tinggi (KCKT)

Basa DNA dipisahkan menggunakan KCKT dengan kolom penukar kation kuat dan fase gerak amonium fosfat 0,05 M, pH 2,0 dan kecepatan alir 2,0 ml/menit. Elusi basa DNA dengan menggunakan detektor fluoresensi pada panjang gelombang eksitasi 286 nm dan emisi 366 nm. Kondisi ini diketahui mempunyai resolusi yang baik untuk basa DNA dan yang termetilasi (Herron & Shank, 1979).

Penelitian lain yang juga melakukan pemisahan basa DNA menggunakan Waters HPLC model 484 dengan detektor UV, kolom pasangan ion Beckman Altex Ultrasphere dan penyangga Ultrasphere. Fase gerak yang digunakan yaitu trietilamin 0,1 M, pH 7,0, dan asetonitril 1% yang dicampur selama 20 menit. Konsentrasi asetonitril ditingkatkan menjadi 5% setelah 10 menit, dan dicampur selama 10 menit. Setelah 10 menit konsentrasi asetonitril ditingkatkan menjadi 10%. Laju alir yang digunakan adalah 1 ml/menit dan diukur pada panjang gelombang 254 nm.

Untuk analisis konsentrasi O⁶-metilguanin digunakan HPLC Dionex yang dilengkapi dengan ESA Coulochem Model 5100A dengan detektor elektrokimia dan kolom fase balik Supelco C-18. Fase geraknya adalah sodium asetat 100 mM, pH 7, dan metanol 5%, laju alir 1 ml/menit. Detektor diatur pada 500-650 mV (Reh, 2000).

Analisis *adduct* DNA yaitu O⁶-metilguanin juga pernah dilakukan dengan menggunakan kolom penukar kation kuat (Supelcosil LC-SCX), temperatur kolom 30°C; fase gerak amonium format-metanol (94:6) dengan konsentrasi akhir amonium format 30 mM; pH 3,95, laju alir 1,2 ml/menit dan dengan menggunakan detektor fluoresensi yang diukur pada panjang gelombang eksitasi 300 nm dan panjang gelombang emisi 370 nm (Sari, 2008).

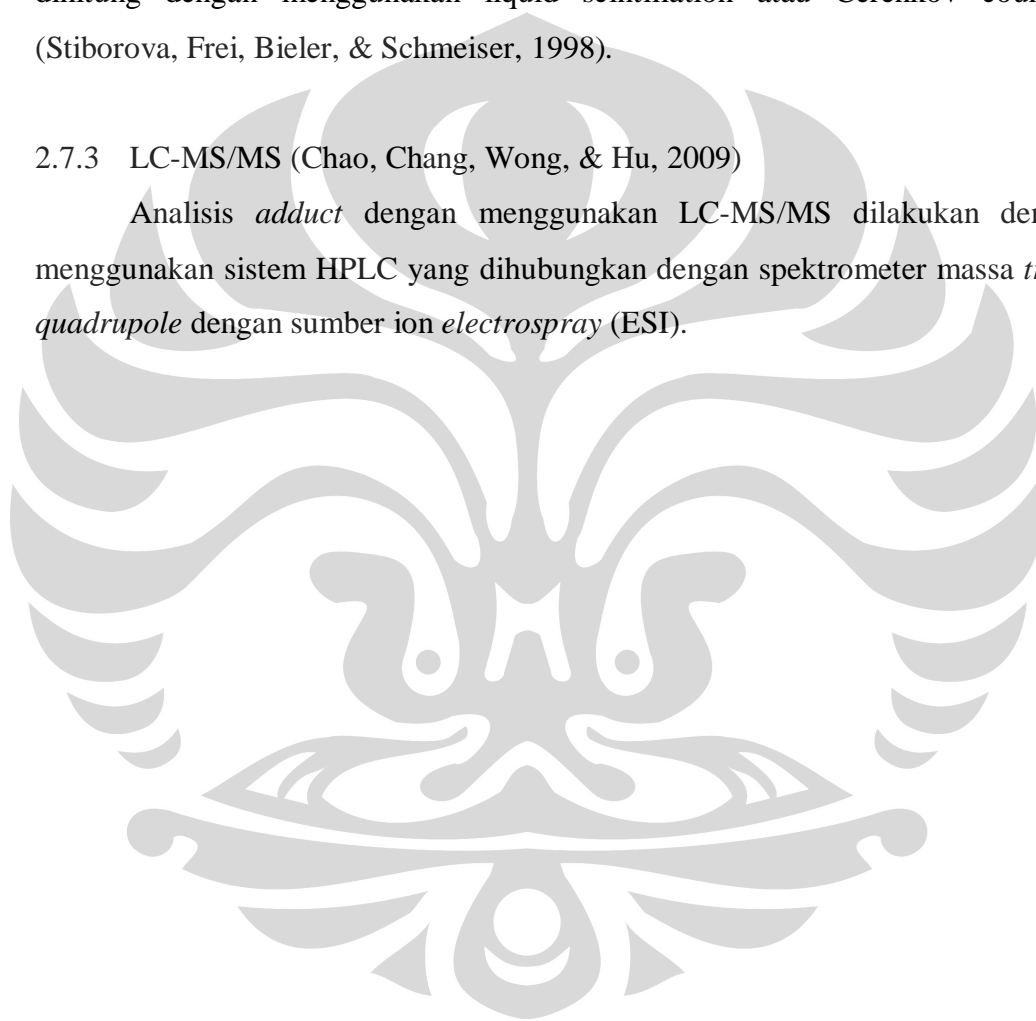
2.7.2 ³²P-Post Labelling

Adduct DNA direaksikan dengan enzim endonuklease dan eksonuklease. Kemudian hasilnya diinkubasi dengan [γ -³²P] ATP, dan ditambahkan carrier ATP

dan T4-polinukleotida kinase pada pH 9,5. Kemudian *adduct* yang telah dilabel dengan ^{32}P dipisahkan dari nukleotida yang belum termodifikasi dengan menggunakan TLC (Thin Layer Chromatography) penukar anion dengan plat polietilenimin selulosa. Fase gerak yang digunakan untuk mengelusi adalah larutan elektrolit. Posisi dari *adduct* akan terlihat pada layar autoradiography dan terlihat seperti titik hitam pada film x-ray. Kemudian area titik hitam tersebut dihitung dengan menggunakan liquid scintillation atau Cerenkov counting (Stiborova, Frei, Bieler, & Schmeiser, 1998).

2.7.3 LC-MS/MS (Chao, Chang, Wong, & Hu, 2009)

Analisis *adduct* dengan menggunakan LC-MS/MS dilakukan dengan menggunakan sistem HPLC yang dihubungkan dengan spektrometer massa *triple quadrupole* dengan sumber ion *electrospray* (ESI).



BAB 3

METODOLOGI PENELITIAN

3.1 Tempat dan Waktu

Penelitian akan dilaksanakan di laboratorium farmakologi, laboratorium bioavailabilitas dan bioekivalensi Departemen Farmasi Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Universitas Indonesia dan bagian instalasi penelitian dan pengembangan Rumah Sakit Kanker Darmas selama lebih kurang empat bulan.

3.2 Alat

Alat – alat yang akan digunakan pada penelitian ini adalah kandang tikus dan perlengkapannya; sonde lambung; timbangan hewan (Mettler-Toledo); keranjang timbangan; sarung tangan; koran; pipet hematokrit; tabung K₃EDTA; spuit 2,5 ml dan 1 ml; KCKT yang terdiri dari kolom (Supelcosil LC-SCX 5 μ m, 250 x 4,6 mm), pompa (Shimadzu LC-10AD vp), oven kolom (TC 1900), detektor fluoresensi (Shimadzu RF-10A xl), *system controller* (Shimadzu SCL-10A vp) dan rekorder (Shimadzu Class-VP); syringe 100 μ l (Hamilton); penyaring eluen 0,45 μ m (Whatman); lemari pendingin (Samsung Cooltech Bio); *vortex* (Maxi Mix II); *termomixer* (Eppendorf); alat sentrifugasi (DSC-300 SD); timbangan analitik (AND); pengaduk ultrasonik (Elmasonic); pipet eppendorf 10, 100, 1000 μ l; pH meter (Eutech); *sample cup*; spatel; *magnetic stirrer*; *blue tip*; *yellow tip*; *white tip*; *penangas air*; kapas; *tabung conical* 15 ml; *DNA quantitizer*; alat-alat gelas.

3.3 Bahan

Bahan – bahan yang digunakan dalam penelitian ini adalah standar Nitrosodimetilamin (Wako Pure Chemicals); dimetilamin (Merck); natrium nitrit (Merck); makanan tikus; eter (Merck); O⁶-metilguanin (Aldrich); N⁷-metilguanin (Fluka); guanin (Sigma); adenin (Sigma); metanol HPLC grade (Merck);

amonium dihidrogen fosfat (Merck); asam klorida (Merck); Kalium dihidrogen fosfat (Merck); akuabidestilata (Kharisma Utama); tris; amonium klorida; kalium karbonat; Na₂EDTA; natrium klorida; sodium dodesil sulfat (SDS); natrium hidroksida; fenol (Merck); kloroform (Merck); hidrokuinon (Merck); proteinase K (Fermentas); etanol absolut (Merck); etanol 70%; akuadestilata.

3.4 Hewan Uji

Hewan uji yang digunakan adalah tikus putih dewasa jantan galur *Sprague-Dawley* dengan bobot 140-200 gram. Hewan uji diperoleh dari Bagian Non-Ruminansia dan satwa Harapan di Fakultas Peternakan Institut Pertanian Bogor.

3.5 Cara Kerja

3.5.1 Pembuatan Larutan Standar

3.5.1.1 Pembuatan Larutan Standar O⁶-metilguanin 1000 µg/ml

Standar O⁶-metilguanin ditimbang secara seksama sebanyak 10 mg, kemudian dimasukkan ke dalam labu ukur 10 ml dan dilarutkan dengan asam klorida 0,1 N sampai tanda batas. Untuk mendapatkan larutan dengan konsentrasi yang lebih rendah, dilakukan pengenceran dari larutan induk secara kuantitatif.

3.5.1.2 Pembuatan Larutan Standar N⁷-metilguanin 1000 µg/ml

Standar N⁷-metilguanin ditimbang secara seksama sebanyak 10 mg, kemudian dimasukkan ke dalam labu ukur 10 ml dan dilarutkan dengan asam klorida 0,1 N sampai tanda batas. Untuk mendapatkan larutan dengan konsentrasi yang lebih rendah, dilakukan pengenceran dari larutan induk secara kuantitatif.

3.5.1.3 Pembuatan Larutan Standar Guanin 100 µg/ml

Standar guanin ditimbang secara seksama sebanyak 5 mg, kemudian dimasukkan ke dalam labu ukur 50 ml dan dilarutkan dengan asam klorida 0,1 N sampai tanda batas. Untuk mendapatkan larutan dengan konsentrasi yang lebih rendah, dilakukan pengenceran dari larutan induk secara kuantitatif.

3.5.1.4 Pembuatan Larutan Standar Adenin 1000 $\mu\text{g/ml}$

Standar adenin ditimbang secara seksama sebanyak 10 mg, kemudian dimasukkan ke dalam labu ukur 10 ml dan dilarutkan dengan asam klorida 0,1 N sampai tanda batas. Untuk mendapatkan larutan dengan konsentrasi yang lebih rendah, dilakukan pengenceran dari larutan induk secara kuantitatif.

3.5.1.5 Pembuatan Campuran Larutan Standar O⁶-metilguanin 0,1 $\mu\text{g/ml}$, N⁷-metilguanin 1,5 $\mu\text{g/ml}$, Guanin 1 $\mu\text{g/ml}$ dan Adenin 7,5 $\mu\text{g/ml}$.

Larutan induk O⁶-metilguanin, N⁷-metilguanin dan guanin dengan konsentrasi 10,0 $\mu\text{g/ml}$ dipipet sebanyak 100,0 μl ; 1500 μl dan 1000 μl , sedangkan untuk larutan adenin dengan konsentrasi 1000 $\mu\text{g/ml}$ dipipet sebanyak 75 μl , lalu masing – masing larutan induk dimasukkan ke dalam labu ukur 10 ml dan dilarutkan dengan asam klorida 0,1 N sampai tanda batas.

3.5.1.6 Pembuatan Larutan Standar Nitrosodimetilamin 10,66 mg/ml

Sebanyak 0,1 ml nitrosodimetilamin dengan konsentrasi 1,066 g/ml dimasukkan ke labu ukur 10 ml dan dilarutkan dengan air/dapar tris HCl 0,01 M sampai tanda batas.

3.5.2 Pembuatan Fase Gerak Amonium Fosfat 0,04 M

Sebanyak 4,6 g amonium fosfat ditimbang kemudian dilarutkan dalam 800 ml air. pH larutan dibuat hingga mencapai pH 3,00 dengan penambahan asam fosfat. Kemudian akuabides ditambahkan kembali sampai volume mencapai 1 l.

3.5.3 Pembuatan Larutan yang Digunakan untuk Isolasi DNA

3.5.3.1 Pembuatan Larutan Pelisis (Sambrook, Fritsch, & Maniatis, 1989)

Sebanyak 8,29 g amonium klorida; 1,0 g kalium karbonat; dan 0,034 g Na₂EDTA ditimbang dengan seksama. Semua bahan dilarutkan dalam 800 ml akuades. Setelah larut, buat pH larutan menjadi 7,4 dengan penambahan asam klorida atau natrium hidroksida 1 M. Kemudian cukupkan volumenya hingga 1 l dengan penambahan akuades.

3.5.3.2 Pembuatan Dapar Saline-EDTA (dapar SE) (Sambrook, Fritsch, & Maniatis, 1989)

Sebanyak 4,39 g natrium klorida dan 8,41 g Na₂EDTA ditimbang kemudian dilarutkan dalam 900 ml akuades. pH larutan dibuat hingga mencapai pH 8,0 dengan penambahan natrium hidroksida 1 M. Kemudian akuades ditambahkan kembali sampai volume mencapai 1 l.

3.5.3.3 Pembuatan Tris-EDTA (TE) (Sambrook, Fritsch, & Maniatis, 1989)

Sebanyak 0,034 g Na₂EDTA ditimbang, kemudian dimasukkan ke dalam wadah. Ke dalam wadah tersebut kemudian ditambahkan 1 ml Tris-HCl 1 M pH 8,0. Akuades ditambahkan hingga volume mencapai 100 ml.

3.5.3.4 Pembuatan Larutan Tris-HCl 1 M pH 8 (Sambrook, Fritsch, & Maniatis, 1989)

Sebanyak 121,1 g basa Tris ditimbang, kemudian dilarutkan dalam 800 ml akuades. pH larutan dibuat 8 dengan penambahan asam klorida pekat. Akuades ditambahkan kembali sampai volume mencapai 1 l.

3.5.3.5 Pembuatan Larutan Kalium Dihidrogen Fosfat 0,2 M pH 4,0

Ditimbang 27,218 gram kalium dihidrogen fosfat, masukkan ke dalam labu ukur 1000,0 ml, lalu dilarutkan dalam 800 ml air bebas karbondioksida, kemudian dicukupkan volumenya dengan air bebas karbondioksida hingga diperoleh volume akhir 1 liter. Untuk membuat larutan dengan konsentrasi yang lebih rendah, dilakukan pengenceran dari larutan induk.

3.5.3.6 Pembuatan Larutan Proteinase K (10 mg/ml)

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

3.5.3.7 Pembuatan Larutan Sodium Dodesil Sulfat (SDS) 10% (Sambrook, Fritsch, & Maniatis, 1989)

Sebanyak 100 g SDS ditimbang kemudian dilarutkan dalam akuades 900 ml dan dipanaskan pada suhu 68°C untuk membantu kelarutan. pH larutan dibuat hingga mencapai 7,2 dengan penambahan asam klorida encer. Kemudian akuades ditambahkan kembali sampai volume mencapai 1 l.

3.5.3.8 Pembuatan Larutan Fenol-Kloroform (1:1) (Sambrook, Fritsch, & Maniatis, 1989)

Sebanyak 50 g fenol kristal ditimbang dan dimasukkan ke dalam beaker glass 500 ml, kemudian dicairkan di dalam penangas air pada suhu 68°C. Kloroform dengan volume sebanding dengan volume fenol ditambahkan ke dalam beaker glass yang telah berisi fenol cair, lalu campuran diaduk hingga homogen. Sebanyak 0,4 g hidrokinon ditimbang kemudian ditambahkan ke dalam campuran. Dapar Tris-HCl 0,1 M pH 8,0 ditambahkan ke dalam larutan sebanyak tiga kali dengan masing-masing volume penambahan adalah sebanding dengan volume fenol. Setelah masing-masing penambahan dapar Tris-HCl, larutan diaduk dengan stirrer selama 10 sampai 20 menit sehingga terlihat dua lapisan cairan bening di bagian atas dan cairan kuning di bagian bawah. Lapisan atas dibuang, sedangkan lapisan bawah disimpan dalam botol tertutup rapat dan dibungkus aluminium foil.

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

Kondisi awal yang digunakan untuk analisis adalah berdasarkan penelitian sebelumnya yaitu dengan menggunakan kolom penukar kation kuat (Supelcosil LC-SCX), temperatur kolom 30°C; fase gerak ammonium format-metanol (94:6) dengan konsentrasi akhir ammonium format 30 mM; pH 3,95, laju alir 1,2 ml/menit dan dengan menggunakan detektor fluoresensi yang diukur pada panjang gelombang eksitasi 300 nm dan panjang gelombang emisi 370 nm (Sari, 2008). Namun, setelah dilakukan berbagai variasi komposisi fase gerak, laju alir dan suhu, N⁷-metilguanin dan adenin masih belum terpisah dengan baik, sehingga

digunakan metode baru dengan modifikasi dari literatur yang diperoleh yaitu dengan menggunakan fase gerak amonium fosfat (Herron & Shank, 1979).

Sebanyak 20,0 μL campuran larutan standar O⁶-metilguanin 0,1 $\mu\text{g/ml}$, N⁷-metilguanin 1,5 $\mu\text{g/ml}$, guanin 1 $\mu\text{g/ml}$ dan adenin 7,5 $\mu\text{g/ml}$ disuntikkan ke dalam KCKT dengan menggunakan variasi konsentrasi fase gerak masing – masing yaitu dengan menggunakan amonium fosfat 40 mM, 50 mM, 60 mM pH 3,00. Kecepatan alir yang digunakan adalah 1,5 mL/menit, suhu kolom 30°C, dan dideteksi pada panjang gelombang eksitasi 286 nm dan emisi 366 nm. Kemudian dicatat waktu retensi (t_R), dihitung jumlah lempeng teoritis (N), HETP, dan faktor ikutan (Tf). Komposisi fase gerak yang dipilih ditentukan pada kondisi yang memberikan N yang tinggi, HETP yang rendah dan memiliki resolusi yang baik.

3.5.5 Validasi Metode Analisis

3.5.5.1 Uji Kesesuaian Sistem

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

3.5.5.2 Uji Selektivitas

Sebanyak 20,0 μL larutan standar O⁶-metilguanin 0,1 $\mu\text{g/ml}$, N⁷-metilguanin 1,5 $\mu\text{g/ml}$, guanin 1 $\mu\text{g/ml}$, dan adenin 7,5 $\mu\text{g/ml}$ disuntikkan ke dalam KCKT pada kondisi analisis terpilih, kemudian dicatat waktu retensi dari masing-masing standar.

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

Sebanyak 20,0 μL campuran larutan standar O^6 -metilguanin dengan konsentrasi 1; 2; 5; 20; 50; 100; 200; 400, dan 500 ng/ml dan N^7 -metilguanin dengan konsentrasi 10; 20; 50; 200; 500; 1000; 2000; 4000, dan 5000 ng/ml disuntikkan ke dalam alat KCKT pada kondisi analisis terpilih. Area yang diperoleh kemudian dicatat dan dibuat kurva kalibrasinya, lalu dihitung koefisien korelasinya (r) serta harga LOD dan LOQ.

3.5.5.4 Uji Ketepatan (Akurasi) dan Keseksamaan (Presisi)

Sebanyak 20,0 μL campuran larutan standar O^6 -metilguanin dengan konsentrasi 0,18; 0,29; 0,4 $\mu\text{g/ml}$ dan N^7 -metilguanin dengan konsentrasi 2,6; 3,3; 4 $\mu\text{g/ml}$ disuntikkan ke dalam KCKT pada kondisi analisis terpilih. Prosedur diulangi sebanyak enam kali. Dari area yang diperoleh, dihitung % differensiasi, simpangan baku relatif dan koefisien variasinya. Konsentrasi larutan standar dihitung dengan menggunakan kurva kalibrasi baru yang dibuat pada hari akurasi presisi dilakukan.

3.5.5.5 Uji Stabilitas

Sebanyak 20 μl campuran larutan standar O^6 -metilguanin 0,1 $\mu\text{g/ml}$ dan N^7 -metilguanin 1 $\mu\text{g/ml}$ disuntikkan ke dalam alat KCKT pada kondisi analisis terpilih. Area yang diperoleh dicatat, dihitung simpangan baku relatif dan koefisien variansinya. Simpan larutan dalam lemari pendingin. Prosedur ini diulangi kembali, pada hari ke dua dan ke tiga dengan frekuensi penyuntikan masing-masing tiga kali.

3.5.6 Reaksi DNA dengan Nitrosodimetilamin *In Vitro*

DNA yang diisolasi dari darah ditambahkan 1 mM EDTA. Reaksikan DNA dengan 0,751 ml nitrosodimetilamin dalam dapar tris 0,01 M pH 7,5. Kemudian larutan diinkubasi selama 10 jam pada suhu 37°C . Setelah diinkubasi, endapkan DNA dengan menggunakan 2x volume etanol absolut. Sentrifus pada

3000 rpm selama 10 menit. Pindahkan supernatan ke tabung lain. Hidrolisis endapan dan supernatan dengan larutan HCl 0,1 N pada suhu 70°C selama 30 menit, dan suntikan aliquot ke KCKT sebanyak 20 μ l.

3.5.7 Reaksi Guanin dengan Nitrosodimetilamin *In Vitro*

Guanin sebanyak 5 mg dilarutkan dalam 2 ml larutan kalium dihidrogen fosfat 5 mM dengan larutan nitrosodimetilamin 0,751 ml dalam dapar Tris 0,01 M pH 7,5, dan diinkubasi pada suhu 37°C selama 6 jam. Guanin yang teralkilasi diendapkan dengan menggunakan larutan etanol absolut, disentrifugasi dengan kecepatan 3.000 putaran per menit selama 10 menit, dicuci kembali endapan guanin teralkilasi dengan menggunakan larutan etanol 70%, dan disentrifugasi kembali. Endapan guanin dan supernatan dihidrolisis dengan menggunakan 1 ml larutan asam klorida 0,1 N pada suhu 70°C selama 30 menit. Hasil hidrolisis guanin dan supernatan disuntikkan sebanyak 20 μ l ke KCKT pada kondisi analisis terpilih.

3.5.8 Perlakuan terhadap Hewan Uji

3.5.8.1 Orientasi Penentuan Dosis NaNO₂ untuk Pembentukan *Adduct* DNA Maksimum pada Tikus

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

Tabel 3.1 Perlakuan untuk orientasi dosis NaNO₂

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

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

3.5.8.2 Persiapan Hewan Uji

Jumlah hewan yang digunakan dalam percobaan adalah 4 ekor untuk setiap kelompok yang dihitung berdasarkan rumus Federer sebagai berikut :

$$(t-1)(n-1) \geq 15 \quad (3.1)$$

di mana : t adalah jumlah perlakuan

n adalah jumlah pengulangan untuk tiap perlakuan

Pada penelitian ini, $t = 6$, maka $n \geq 4$, berarti jumlah tikus minimal yang dibutuhkan untuk setiap kelompok adalah 4 ekor. Sebelum diberi perlakuan seluruh hewan diaklimatisasi terlebih dahulu selama dua minggu. Selama aklimatisasi dilakukan pengamatan berupa kesehatan dan keadaan umum terhadap hewan uji. Hewan uji yang sehat dapat dilihat dari adanya peningkatan berat badan, mata jernih, dan bulu tidak berdiri. Aklimatisasi tersebut dilakukan agar hewan dapat beradaptasi dengan lingkungan baru untuk meminimalisasi faktor-faktor luar yang dapat mempengaruhi hasil penelitian. Oleh karena itu selama masa aklimatisasi dan masa penelitian berlangsung seluruh hewan uji diberi perlakuan dalam kondisi yang sama.

3.5.8.3 Pemberian Perlakuan

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

Tabel 3.2 Kelompok Perlakuan Uji

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

3.5.8.4 Cara Pengambilan Darah Tikus

Setelah waktu yang telah ditentukan, tikus terlebih dahulu dianestesi secara inhalasi dengan eter. Darah tikus diambil dari sinus orbital mata dengan menggunakan pipet hematokrit. Pengambilan darah dapat dilakukan melalui 5 cara, yaitu memotong ujung ekor, dari sinus orbitalis, dekapitasi lalu darah dikumpulkan, dari jantung, dan dari vena jugularis. Pemilihan sinus orbitalis

adalah dikarenakan pengambilan darah dengan cara ini merupakan cara yang mudah, bisa memperoleh darah yang banyak, lebih sederhana dan menghindari faktor pembekuan darah karena prosesnya cepat. Sebanyak 3 ml darah diambil, dimasukkan dalam tabung K₃EDTA, kemudian dilakukan pengisolasian DNA dalam darah dengan menggunakan prosedur isolasi DNA seperti yang tertera pada prosedur 3.5.8.5.

3.5.8.5 Prosedur Isolasi DNA (National Institutes of Health, 2004)

Sebanyak 3 ml darah ditambahkan dengan 7 ml larutan pelisis (*lysing solution*). Kemudian larutan disentrifugasi pada 3.000 rpm, selama 10 menit pada suhu 4°C. Supernatan yang diperoleh dibuang dan pelet yang dihasilkan ditambahkan dengan 2 ml dapar SE, ditambahkan 20 µl proteinase K (10 mg/ml) dan 100 µl larutan SDS 10%. Kemudian larutan diinkubasi pada suhu 37°C selama 60 menit, dan setelah diinkubasi, ditambahkan dengan fenol : kloroform (1:1) sebanyak satu kali volume larutan, kemudian dikocok selama 15 menit. Lalu larutan disentrifugasi pada 2.500 rpm, selama 20 menit pada suhu 20°C. Supernatan dari larutan diambil, kemudian dipindahkan ke dalam tabung baru. Pada larutan tersebut ditambahkan etanol absolut sebanyak dua kali volume larutan, kemudian larutan disentrifugasi pada 12.000 rpm, selama 10 menit pada 4°C. Pelet yang dihasilkan diambil dan dicuci dengan etanol 70% sebanyak satu kali volume, dan disentrifugasi pada 12.000 rpm selama 5 menit. Pelet yang dihasilkan dicuci kembali dengan etanol 70% sebanyak satu kali volume dan disentrifugasi pada 12.000 rpm selama 5 menit. Pelet yang diperoleh dilarutkan dalam akuades dan disimpan dalam freezer (suhu -20°C) sampai waktu akan dianalisis.

3.5.8.6 Penentuan Waktu Retensi DNA (tanpa hidrolisis)

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

3.5.8.7 Penentuan Waktu Retensi DNA (dengan hidrolisis)

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



BAB 4

HASIL DAN PEMBAHASAN

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

Analisis N⁷-metilguanin dan O⁶-metilguanin dilakukan dengan menggunakan metode kromatografi cair kinerja tinggi (KCKT) penukar kation kuat (strong cation exchange/SCX) dan detektor fluoresensi (Gambar 4.1). Adapun alasan digunakan KCKT karena metode ini cukup sederhana, dan dapat mendeteksi *adduct* dalam kadar yang rendah, penyiapan sampel sederhana, hasil pemisahan baik, detektor sensitif dengan kolom yang selektif, kolom dapat digunakan kembali serta ideal untuk molekul besar dan ion (Johnson & Stevenson, 1991).

Kolom yang digunakan untuk memisahkan komponen DNA dalam penelitian ini adalah kolom penukar kation kuat. Alasan tidak digunakan kolom fase balik adalah karena pemisahan kolom fase balik berdasarkan polaritas, sedangkan basa DNA dan derivat teralkilasinya memiliki polaritas hampir sama karena struktur kimia yang mirip satu sama lain. Komponen-komponen DNA yang akan dipisahkan merupakan basa lemah yang dapat terionisasi dan bersaing dengan ion lawan yang terdapat dalam fase gerak untuk berikatan dengan resin penukar ion tetap yang terdapat dalam fase diam, sehingga penggunaan kolom penukar ion dapat dijadikan pilihan untuk memisahkan basa DNA (Engelhardt, 1996).

Kolom penukar ion dapat dibedakan menjadi dua, yaitu kolom penukar kation dan kolom penukar anion. Pada resin penukar kation terdapat gugus aktif bermuatan negatif yang akan berikatan dengan ion positif dari sampel. Sedangkan pada resin penukar anion terdapat gugus aktif bermuatan positif yang akan berikatan dengan ion negatif dari sampel. Karena komponen DNA merupakan basa lemah yang akan terionisasi dan menghasilkan kation, maka dalam

penelitian ini digunakan kolom penukar kation. Terdapat dua macam kolom penukar kation, yakni kolom penukar kation kuat dan kolom penukar kation lemah. Kolom penukar kation kuat memiliki rentang pH yang lebih lebar dibandingkan dengan kolom penukar kation lemah. Basa DNA membutuhkan suasana asam kuat untuk dapat terprotonasi dan pada pH yang sangat rendah resin penukar ion dalam kolom dapat terprotonasi, sehingga pemisahan memiliki efisiensi yang lebih baik jika digunakan kolom penukar kation kuat (Harahap, Hayun, & Irawati, 2008).

Pemisahan dengan kromatografi penukar ion biasanya menggunakan dapar dalam air sebagai eluen. Dapar yang digunakan adalah dapar amonium fosfat. Amonium fosfat akan terprotonasi menjadi kation yang bermuatan positif (NH_4^+) yang akan berperan sebagai ion lawan. Kolom penukar kation kuat memiliki gugus asam sulfonat ($-\text{SO}_3\text{H}$) yang akan terion menjadi anion yang bermuatan negatif ($-\text{SO}_3^-$) yang dengan adanya ion lawan yang terdapat dalam fase gerak akan membentuk suatu molekul netral. Sampel yang berupa komponen DNA akan terion menjadi kation dan kemudian akan berkompetisi dengan ion lawan untuk berikatan dengan ion yang terdapat dalam fase diam. Pemisahan didasarkan pada perbedaan kekuatan interaksi antara ion sampel dengan ion muatan tetap. Jika ion sampel berikatan kuat dengan ion muatan tetap maka ion sampel akan tertahan lebih lama di dalam kolom sehingga akan terelusi lebih lama, begitu juga sebaliknya (Harahap, Suryadi, & Winandar, 2004).

Metode KCKT yang digunakan dalam penelitian ini menggunakan detektor fluoresensi. Adapun alasan digunakannya detektor fluoresensi yaitu karena guanin, nukleosida, nukleotida dan derivat teralkilasinya termasuk N^7 -metilguanin dan O^6 -metilguanin memiliki intensitas yang besar untuk berfluoresensi di antara basa pirimidin dan basa purin lainnya. O^6 -metilguanin memiliki kadar yang rendah sehingga dibutuhkan detektor yang lebih sensitif dan detektor fluoresensi menghasilkan sensitivitas 10 – 100 kali lebih tinggi daripada detektor uv.

Kondisi optimum untuk melakukan analisis N^7 -metilguanin dan O^6 -metilguanin adalah dengan menggunakan kolom penukar kation kuat Supelcosil

LC-SCX (5 μm , 250 x 4,6 mm) dengan fase gerak dapar amonium fosfat. Konsentrasi amonium fosfat yang digunakan adalah 0,04 M, pH 3,00, kecepatan alir 1,5 mL/menit, suhu kolom 30°C, dan dilengkapi dengan detektor fluoresensi pada panjang gelombang eksitasi 286 nm dan emisi 366 nm.

Keseluruhan metode yang digunakan adalah metode baru yang dikembangkan melalui modifikasi berdasarkan literatur yang diperoleh (Herron & Shank, 1979) dengan menggunakan dapar amonium fosfat. Awalnya telah digunakan metode berdasarkan penelitian sebelumnya (Sari, 2008) yaitu dengan fase gerak amonium format. Berbagai modifikasi juga dilakukan mulai dari pengubahan komposisi fase gerak, pengubahan laju alir dan pengubahan pH, namun adenin dan N⁷-metilguanin masih belum terpisah dengan baik, sehingga dicari metode baru yang dapat memisahkan kedua komponen tersebut.

Berdasarkan literatur yang diperoleh, pemisahan *adduct* DNA ini dapat dilakukan dengan menggunakan kolom penukar kation kuat, fase gerak dapar amonium fosfat 50 mM dan pH 2,00 (Herron & Shank, 1979). Modifikasi dilakukan pada konsentrasi fase gerak dan pH dikarenakan kolom penukar kation kuat sebaiknya digunakan dalam rentang pH 3,00 hingga 7,00 dan penggunaan dapar amonium fosfat dengan konsentrasi 40 mM pH 3,00 memiliki resolusi yang lebih baik (Lampiran 4.1), serta nilai N yang lebih tinggi dan HETP yang lebih rendah (Lampiran 4.2). Data resolusi, N dan HETP optimasi konsentrasi fase gerak dapat dilihat pada Tabel 4.1, 4.2 dan 4.3.

Pencarian kondisi analisis yang optimum dilakukan untuk mendapatkan kondisi analisis yang memberikan hasil pemisahan yang baik dengan waktu analisis yang singkat. Untuk mencari kondisi analisis yang optimum, campuran larutan standar N⁷-metilguanin dan O⁶-metilguanin dengan konsentrasi 1 $\mu\text{g/ml}$ dan 100,0 ng/mL disuntikkan ke dalam KCKT. Berdasarkan kromatogram yang diperoleh, dapat dihitung jumlah lempeng teoritis (N) dan HETP yang menunjukkan efisiensi kolom. Keadaan kromatografi yang ideal memiliki N yang lebih besar dari 2500 dan HETP yang rendah.

4.2 Validasi Metode Analisis

4.2.1 Uji Kesesuaian Sistem (Farmakope Indonesia edisi keempat, 1995)

Uji kesesuaian sistem dilakukan untuk mengetahui apakah metode yang akan digunakan dapat dipakai untuk menganalisis komponen yang akan dipisahkan. Kesesuaian sistem dapat dilihat dari beberapa parameter, yaitu efisiensi kolom (pelat teoritis (N) dan HETP), faktor ikutan, koefisien variasi dan resolusi. Uji resolusi dilakukan dengan menggunakan campuran larutan standar guanin, adenin, N⁷-metilguanin dan O⁶-metilguanin dengan konsentrasi masing-masing 1,03; 7,5; 1,5; dan 0,1 µg/ml. Berdasarkan data yang dapat dilihat pada Tabel 4.4 dan Tabel 4.5 terlihat bahwa metode analisis yang digunakan memberikan jumlah pelat teoritis di atas 2500 dan keterulangan di bawah 2% serta memisahkan komponen-komponen campuran dengan hasil resolusi di atas 1,5. Hal ini menunjukkan bahwa metode dapat digunakan untuk menganalisis komponen-komponen dalam sampel. Adapun kromatogram campuran larutan standar guanin, adenin, N⁷-metilguanin dan O⁶-metilguanin dapat dilihat pada Gambar 4.2.

4.2.2 Uji Selektivitas

Uji selektivitas dilakukan untuk mengetahui adanya gangguan oleh komponen lain. Standar yang digunakan yaitu guanin, adenin, N⁷-metilguanin dan O⁶-metilguanin. Guanin dan adenin adalah komponen yang akan ditemukan di dalam sampel karena merupakan komponen basa DNA. Adapun waktu retensi dari guanin, adenin, N⁷-metilguanin dan O⁶-metilguanin berturut-turut yaitu 4,175; 5,567; 6,367 dan 12,608 menit. Kromatogram dari semua standar dapat dilihat pada Gambar 4.3. Dari kromatogram yang diperoleh, dapat dilihat bahwa metode yang digunakan cukup selektif untuk mendeteksi N⁷-metilguanin dan O⁶-metilguanin dalam sampel, yaitu berdasarkan nilai resolusi di atas 1,5 dan pada waktu retensi zat tidak terdapat gangguan lain.

4.2.3 Pembuatan Kurva Kalibrasi dan Uji Linearitas

Konsentrasi N⁷-metilguanin yang digunakan pada data kurva kalibrasi adalah 10,3; 20,6; 51,5; 206; 515; 1030; 2060; 4120; dan 5150 ng/mL, sedangkan konsentrasi O⁶-metilguanin yang digunakan adalah 1,002; 2,004; 5,01; 20,04; 50,1; 100,2; 200,4; 400,8; dan 501,0 ng/mL. Kurva kalibrasi N⁷-metilguanin yang diperoleh memiliki persamaan garis $y = 215,8614x - 2.044,38$ dengan harga koefisien korelasi (r) sebesar 0,9999, dan kurva kalibrasi O⁶-metilguanin yang diperoleh memiliki persamaan garis $y = 7877,376x - 1034,14$ dengan harga koefisien korelasi (r) sebesar 0,9999. Koefisien korelasi yang diperoleh lebih besar dari 0,999. Hal ini menunjukkan bahwa pada rentang konsentrasi yang digunakan diperoleh suatu korelasi yang linear antara konsentrasi dengan area yang diperoleh. Data kurva kalibrasi N⁷-metilguanin beserta Gambar dapat dilihat pada Tabel 4.7 dan Gambar 4.4, dan data kurva kalibrasi O⁶-metilguanin beserta Gambar dapat dilihat pada Tabel 4.8 dan Gambar 4.5.

Selain koefisien korelasi, parameter yang digunakan untuk mengetahui linearitas kurva kalibrasi yang diperoleh adalah koefisien fungsi regresi (V_{x_0}). Koefisien fungsi regresi yang diperoleh dari kurva kalibrasi N⁷-metilguanin adalah 1,58%, dan O⁶-metilguanin adalah 1,99%. Hal ini menunjukkan bahwa pada konsentrasi yang digunakan diperoleh linearitas yang cukup baik. V_{x_0} untuk kurva kalibrasi O⁶-metilguanin meskipun masih dalam rentang yaitu 2% namun hampir mendekati batas yaitu 1,99%. Hal ini mungkin dikarenakan kromatogram dari O⁶-metilguanin cukup berekor sehingga agak sulit untuk memperoleh linearitas yang baik. Data linearitas selengkapnya dapat dilihat pada Tabel 4.9 dan 4.10 (Lampiran 4.4).

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

Batas deteksi adalah jumlah terkecil analit dalam sampel yang dapat dideteksi yang masih memberikan respon signifikan dibandingkan dengan blanko. Sedangkan batas kuantitasi merupakan parameter pada analisis renik dan diartikan sebagai kuantitas terkecil analit dalam sampel yang masih dapat memenuhi kriteria cermat dan seksama. Jadi, semakin kecil batas deteksi dan batas kuantitasi

maka analisis semakin baik karena dapat mendeteksi kadar sampel dengan kadar yang kecil. Batas deteksi dan batas kuantitasi diperoleh melalui perhitungan statistik. Uji batas deteksi (LOD) dan uji batas kuantitasi (LOQ) untuk N⁷-metilguanin dan O⁶-metilguanin yang diperoleh dari hasil validasi relatif cukup rendah yaitu LOD sebesar 69,0071 ng/mL dan LOQ sebesar 230,0237 ng/ml untuk N⁷-metilguanin, sedangkan O⁶-metilguanin mempunyai LOD sebesar 6,7621 ng/mL dan LOQ sebesar 22,5403 ng/mL (Lampiran 4.5). Data selengkapnya dapat dilihat pada Tabel 4.11 dan 4.12.

4.2.5 Uji Ketepatan (Akurasi) dan Keseksamaan (Presisi)

Uji ketepatan (akurasi) dilihat dari parameter persen differensiasi (%diff) sedangkan uji keseksamaan (presisi) dilihat dari parameter koefisien variasi. Uji akurasi dilakukan dengan metode perbandingan dengan standar. Semua data uji akurasi yang diperoleh memberikan nilai %diff yang berada dalam rentang -2 sampai 2%.

Uji perolehan kembali (UPK) tidak dilakukan karena *adduct* yang terbentuk merupakan hasil reaksi sehingga dengan adanya sedikit saja perbedaan kondisi yang membantu terjadinya reaksi akan menimbulkan perbedaan kuantitas hasil reaksi. Untuk uji presisi, konsentrasi yang digunakan adalah 2,678; 3,399; dan 4,120 µg/ml, sedangkan untuk O⁶-metilguanin yaitu 0,186; 0,300; dan 0,414 µg/ml. Data uji presisi untuk N⁷-metilguanin dengan konsentrasi sebesar 2,678; 3,399; dan 4,120 µg/ml memberikan harga koefisien variasi berturut-turut yakni 0,72 ; 0,57; dan 0,42%, sedangkan data uji presisi untuk O⁶-metilguanin dengan konsentrasi sebesar 0,186; 0,300; dan 0,414 µg/ml memberikan harga koefisien variasi berturut-turut yakni 0,64 ; 1,02; dan 1,09% (Lampiran 4.3 dan 4.6). Data selengkapnya dapat dilihat pada Tabel 4.13 dan 4.14.

4.2.6 Uji Stabilitas

Uji stabilitas N⁷-metilguanin dan O⁶-metilguanin selama 3 hari berturut dengan konsentrasi 1,03 dan 0,1 µg/mL memberikan harga koefisien variasi sebesar 1,74% dan 1,94%. Hal ini menunjukkan bahwa larutan standar bersifat

relatif stabil. Uji stabilitas sebenarnya dilakukan juga pada hari ke-9, namun koefisien variasi yang diperoleh sudah melebihi 2%. Data selengkapnya dapat dilihat pada Tabel 4.15 dan 4.16.

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

4.3 Reaksi DNA dengan Nitrosodimetilamin *In Vitro*

Pada penelitian ini juga dilakukan reaksi antara DNA yang diisolasi dari darah tikus dengan nitrosodimetilamin *in vitro* untuk verifikasi. Tujuan dilakukan verifikasi adalah untuk meyakinkan bahwa reaksi antara nitrosodimetilamin dan DNA terjadi. DNA diisolasi dari darah tikus agar hasil yang diperoleh dari simulasi *in vitro* dapat mendekati dan merefleksikan yang terjadi secara *in vivo*.

DNA hasil isolasi dilarutkan dalam aquades sebanyak 0,3 ml. Kemudian dilakukan kuantitasi DNA dan diperoleh konsentrasi DNA sebesar 657,5 µg/ml. Penambahan EDTA dilakukan untuk mencegah nuklease yang dapat mendegradasi DNA. Jumlah nitrosodimetilamin yang ditambahkan berdasarkan LD₅₀ pada tikus yaitu 40 mg/kg (Liteplo, Meek, & Windle, 2002). Perhitungan dapat dilihat pada Lampiran 4.7. Nitrosodimetilamin dilarutkan dalam dapar tris-HCl 0,01 M pH 7,5 hingga mencapai konsentrasi 10,66 mg/ml. DNA hasil isolasi kemudian direaksikan dengan 0,751 ml nitrosodimetilamin dengan konsentrasi 10,66 mg/ml, lalu diinkubasi pada suhu 37°C.

Reaksi antara DNA hasil isolasi dengan nitrosodimetilamin setelah diinkubasi selama 10 jam pada suhu 37°C yang dihidrolisis dengan asam klorida 0,1 N selama 30 menit pada suhu 70°C menghasilkan *adduct* O⁶-metilguanin pada waktu retensi 13,208 menit. Awalnya waktu inkubasi dilakukan selama 6 jam, tetapi tidak ditemukan *adduct* O⁶-metilguanin maupun N⁷-metilguanin. Tidak ditemukan *adduct* ini mungkin dikarenakan reaksi ini berlangsung tanpa enzim

yang dapat mengubah nitrosodimetilamin menjadi bentuk aktif yang mengalkilasi DNA. Reaksi kemudian diperlama waktu inkubasinya menjadi 10 jam, dengan harapan nitrosodimetilamin dapat terhidrolisis menjadi bentuk aktif dengan waktu inkubasi yang lebih lama. Dengan waktu inkubasi yang lebih lama, ditemukan adanya *adduct* O⁶-metilguanin dengan konsentrasi 22,295 ng/ml.

Untuk memastikan jenis *adduct* hasil reaksi, maka dilakukan metode spiking, yaitu penambahan standar dengan konsentrasi yang lebih kurang sama dengan konsentrasi yang terdapat dalam sampel. Jika diperoleh kromatogram dengan waktu retensi yang sama persis, dan kromatogram setelah spiking memiliki area dua kalinya, maka dapat memperkuat bahwa *adduct* hasil reaksi adalah N⁷-metilguanin atau O⁶-metilguanin. Kromatogram yang diperoleh setelah metode spiking mengalami penambahan area yaitu dari 174591 $\mu\text{v/s}$ menjadi 484299 $\mu\text{v/s}$, namun dengan waktu retensi yang lebih awal. Hal ini mungkin dapat dikarenakan *adduct* tersebut merupakan hasil reaksi, sehingga sulit untuk memperoleh hasil yang benar-benar sama. Gambar kromatogram sebelum dan setelah spiking dapat dilihat pada Gambar 4.6 dan 4.7. Gambar kromatogram supernatan dapat dilihat pada Gambar 4.8.

4.4 Reaksi Guanin dengan Nitrosodimetilamin *In Vitro*

Pada penelitian ini juga dilakukan reaksi antara guanin dengan nitrosodimetilamin secara *in vitro*. Guanin merupakan salah satu komponen basa DNA. Reaksi guanin dengan nitrosodimetilamin dilakukan untuk memperkuat reaksi DNA dengan nitrosodimetilamin secara *in vitro*. Guanin sebanyak 5 mg dilarutkan dalam 2 ml kalium dihidrogen fosfat, lalu direaksikan dengan 0,751 ml nitrosodimetilamin, kemudian diinkubasi selama 6 jam. Reaksi antara guanin dengan nitrosodimetilamin setelah diinkubasi selama 6 jam pada suhu 37°C yang dihidrolisis dengan asam klorida 0,1 N selama 30 menit pada suhu 70°C menghasilkan *adduct* N⁷-metilguanin pada waktu retensi 6,525 menit dengan konsentrasi 44,09 ng/ml.

Pada reaksi ini juga dilakukan metode spiking, dan diperoleh kromatogram dengan *adduct* N⁷-metilguanin yang mengalami pertambahan area yaitu dari 7473

$\mu\text{v/s}$ menjadi $14857 \mu\text{v/s}$ dengan waktu retensi yang sama. Gambar kromatogram sebelum dan setelah spiking dapat dilihat pada Gambar 4.9 dan 4.10. Gambar kromatogram supernatan dapat dilihat pada Gambar 4.11. N^7 -metilguanin yang terbentuk menandakan bahwa posisi N^7 dari guanin sangat nukleofil, sehingga mudah diserang oleh elektrofil dari senyawa pengalkil.

4.5 Perlakuan terhadap Hewan Uji

4.5.1 Orientasi Penentuan Dosis NaNO_2 dan Waktu Pembentukan *Adduct* DNA Maksimum pada Tikus

Penelitian ini menggunakan konsep terbentuknya *adduct* setelah pemberian natrium nitrit dan dimetilamin sebagai prekursor terbentuknya nitrosodimetilamin yang merupakan salah satu senyawa karsinogenik. *Adduct* yang terbentuk di antaranya adalah N^7 -metilguanin (70% dari semua *adduct*), O^6 -metilguanin (7%) dan *adduct* lain dalam jumlah kecil yang diantaranya adalah N^3 -metiladenin (3%) dan O^4 -metiltimin (Souliotis, 2002). Dengan pemberian prekursor secara per oral dan berulang selama rentang waktu tertentu pada tikus diharapkan terjadi akumulasi senyawa karsinogenik yang dapat bereaksi dengan DNA membentuk *adduct*. Pada penelitian sebelumnya (Putri, 2009) telah dilakukan pemberian prekursor natrium nitrit dan dimetilamin pada hewan uji dan diperoleh nitrosodimetilamin maksimum dalam rentang waktu 4 jam. Oleh karena itu, penelitian tersebut dilanjutkan dengan menganalisis *adduct* sebagai hasil reaksi prekursor yang menyebabkan terbentuknya nitrosodimetilamin yang akan bereaksi dengan DNA secara *in vivo*.

Percobaan awal dilakukan melalui orientasi variasi dosis untuk mengetahui dosis minimal yang dapat menimbulkan *adduct* tanpa menyebabkan risiko kematian pada tikus. Variasi dosis yang digunakan adalah 0,25, 0,5, dan 1 kali LD_{50} natrium nitrit untuk tikus. Perhitungan dosis dapat dilihat pada Lampiran 4.8. Penggunaan variasi dosis hingga 1 kali LD_{50} adalah dikarenakan pada penelitian sebelumnya (Putri, 2009) mengenai pemberian natrium nitrit dan dimetilamin pada hewan uji, diketahui bahwa dengan pemberian 1 kali LD_{50} , hewan uji tidak mengalami kematian. Sehingga, dalam penelitian ini digunakan

dosis 1 kali LD₅₀ dan divariasikan dengan penurunan dosis. Hal ini dilakukan dengan harapan semakin tinggi dosis NaNO₂ yang diberikan, maka semakin besar kemungkinan terbentuk senyawa nitrosodimetilamin, sehingga lebih besar kemungkinan terbentuknya *adduct* DNA.

Variasi pemberian juga dilakukan pada orientasi ini yaitu pemberian dengan atau tanpa dimetilamin. Secara teoritis natrium nitrit dapat bereaksi dengan amin yang terdapat di dalam tubuh. Variasi pemberian dilakukan untuk melihat apakah ada perbedaan antara pembentukan *adduct* DNA dengan atau tanpa dimetilamin.

Dari orientasi yang dilakukan selama 1 minggu secara per oral pada tikus tidak ditemukan adanya *adduct* DNA. Data zat yang terdeteksi dapat dilihat pada Tabel 4.17. Semua tikus yang diberikan dosis 1 kali LD₅₀ mati. Hal ini mungkin dikarenakan terlalu tingginya dosis sehingga dapat menyebabkan kematian pada tikus akibat toksiknya natrium nitrit. Tikus yang diberi dosis 0,25 kali LD₅₀ mati pada hari kedua setelah pengambilan darah, hal ini mungkin dikarenakan dosis eter yang terlalu besar, sehingga eter menyebabkan anestesi yang terlalu dalam ketika pengambilan darah. Tikus pada yang diberi 0,5 kali LD₅₀ mati pada hari kelima setelah pengambilan darah mungkin dikarenakan pengambilan darah yang terlalu banyak, sedangkan tikus ini mengalami penurunan berat badan yang cukup signifikan yaitu dari 151,0 g hingga mencapai 103,7 g. Selain dikarenakan pengambilan darah terlalu banyak, kematian tikus tersebut dapat juga dikarenakan anestesi eter yang terlalu dalam sehingga dapat menyebabkan kematian. Secara keseluruhan, tikus yang digunakan untuk orientasi dosis mengalami penurunan berat badan dan penurunan keaktifan tingkah laku. Hal ini mungkin dikarenakan natrium nitrit memiliki efek terhadap penurunan nafsu makan (International Agency for Research on Cancer, 2004).

Alasan tidak terdeteksinya *adduct* DNA mungkin dikarenakan jarak antara pemberian terakhir dengan pengambilan darah terlalu lama yaitu 4 jam. Data 4 jam pengambilan darah mengacu pada penelitian sebelumnya di mana kadar nitrosodimetilamin maksimum terbentuk setelah 4 jam (Putri, 2009). *Adduct* O⁶-metilguanin akan hilang dari tubuh mengikuti cara *biphasic* yang terdiri dari fase

cepat ($t_{1/2}$ 1,5 – 1,7 jam) yang kemudian diikuti fase lambat ($t_{1/2}$ 20,7 – 24,9 jam) (Souliotis, et al., 1995). Berdasarkan data $t_{1/2}$ untuk sementara disimpulkan bahwa jarak antara induksi terakhir dengan pengambilan darah yaitu 4 jam terlalu lama, di mana dikhawatirkan *adduct* yang terbentuk telah *direpair* ataupun telah menghilang dari tubuh, sehingga untuk uji sebenarnya dilakukan variasi waktu pengambilan darah. Dosis yang digunakan untuk uji sebenarnya adalah dosis 0,5 kali LD_{50} , hal ini dikarenakan dosis ini adalah dosis terbesar yang tidak menimbulkan toksisitas pada tikus. Satu ekor tikus dari dosis 0,5 kali LD_{50} mengalami kematian, namun hal ini diduga bukan karena toksisitas dari natrium nitrit tetapi dari pengambilan darah yang terlalu banyak dan anestesi yang terlalu dalam.

4.5.2 Pemberian Perlakuan pada Hewan Uji

Setelah diaklimatisasi, hewan uji (tikus) kemudian dipilih yang sehat dan dikelompokkan secara acak menjadi 6 kelompok. Masing – masing kelompok terdiri dari 4 ekor tikus berdasarkan perhitungan dari rumus Federer. Penggunaan kontrol normal bertujuan sebagai pembandingan antara hewan yang tidak diinduksi dengan hewan yang diinduksi. Kontrol positif digunakan untuk mengetahui apakah terdapat perbedaan antara *adduct* yang terbentuk dengan prekursorinya.

Pemberian prekursor yaitu natrium nitrit dan dimetilamin diberikan per oral selama 1 minggu. Hal ini dilakukan berdasarkan penelitian sebelumnya, di mana pemberian nitrosodimetilamin diberikan selama 28 hari, dan diketahui bahwa *adduct* terakumulasi dengan cepat, mencapai *steady state* selama 2 – 7 hari, kemudian turun perlahan setelah 28 hari. Nitrosodimetilamin diberikan dengan dosis 100 $\mu\text{g}/\text{kg}$ bb yang mengacu pada penelitian sebelumnya di mana dengan dosis tersebut sistem perbaikan DNA terakulasi mengikuti fase lambat yaitu 24,8 jam (Souliotis, et al., 1995).

DNA diisolasi dari darah tikus (*whole blood*) yang diambil melalui sinus orbital mata tikus (Gambar 4.12). Sampel darah dimasukkan ke dalam tabung $K_3\text{EDTA}$. Alasan penggunaan tabung $K_3\text{EDTA}$ adalah karena penggunaan antikoagulan ini tidak mempengaruhi sel-sel darah, sehingga ideal untuk

pengujian hematologi. Bila jumlah EDTA kurang, darah dapat mengalami koagulasi. Sebaliknya, bila EDTA berlebih, eritrosit mengalami krenasi, trombosit membesar dan mengalami disintegrasi. Setelah darah dimasukkan ke dalam tabung, segera lakukan pencampuran/homogenisasi dengan cara membolak-balikkan tabung untuk menghindari penggumpalan trombosit dan pembentukan bekuan darah.

Setelah sampel darah diperoleh, selanjutnya dilakukan isolasi DNA dari darah melalui beberapa tahap. DNA terdapat dalam sel yang berinti, dan sel yang berinti di dalam komponen darah adalah sel darah putih. Untuk mengisolasi sel darah putih, maka darah yang masih memiliki komponen-komponen lengkap perlu dipisahkan satu dengan lainnya sehingga yang tersisa hanya sel darah putih. Penambahan larutan pelisis pada awal isolasi dilakukan untuk melisis sel darah merah, kemudian sentrifugasi untuk memisahkan sel darah merah yang berada di lapisan atas. Pelisisan darah merupakan hal yang sangat penting, karena selain membantu menghilangkan protein darah, pelisisan darah menentukan apakah sel darah putih sudah sepenuhnya diisolasi atau belum.

Setelah sel darah putih berhasil diisolasi, perlu dilakukan penghancuran membran sel dan membran nukleus sel darah putih dengan penambahan pelisis sel darah putih yang terdiri dari EDTA dan sodium dodesil sulfat (SDS) yang berfungsi untuk merusak lipid pada membran sel sehingga leukosit hancur. Penambahan proteinase K bertujuan untuk menghancurkan protein yang terdapat di dalam sel darah putih yang terisolasi. Proteinase K bekerja lebih aktif dengan adanya deterjen seperti SDS. Inkubasi yang dilakukan setelahnya bertujuan untuk mengoptimalkan kerja enzim yang sangat dipengaruhi oleh suhu.

Pemisahan komponen yang bersifat hidrofilik dengan komponen yang bersifat hidrofobik dilakukan setelah larutan selesai diinkubasi. Asam nukleat merupakan komponen yang larut dalam air, sehingga untuk memisahkannya dari komponen hidrofobik dibutuhkan pelarut yang tidak bercampur dengan air, dimana dalam penelitian ini digunakan fenol-kloroform (1:1). Kemudian sentrifugasi diperlukan untuk memisahkan keduanya, dan DNA berada pada lapisan atas. Lapisan atas tersebut kemudian dipisahkan dan dilakukan presipitasi

DNA dengan etanol absolut. Pada saat penambahan etanol absolut ini, DNA dapat divisualisasikan, yakni berbentuk seperti fiber yang menggumpal (Gambar 4.13). Fiber tersebut kemudian diambil dan dilakukan pencucian DNA dengan etanol 70% dan disentrifugasi sehingga DNA yang diperoleh merupakan endapan yang berada pada tepi tabung.

Setelah dicuci dengan etanol 70%, endapan yang diperoleh dikeringkan, lalu dilarutkan di dalam akuades steril dan selanjutnya dilakukan kuantitasi. Kuantitasi DNA dilakukan antara lain untuk mengetahui jumlah /konsentrasi DNA yang diperoleh, dan untuk mengetahui kemurnian DNA, yakni dengan menggunakan DNA *quantitizer* yang prinsipnya sama dengan spektrofotometer.

DNA yang diperoleh masih berbentuk untai ganda, sehingga untuk membebaskan basa-basa DNA dan derivat teralkilasinya, DNA yang diperoleh dihidrolisis dengan larutan asam klorida 0,1 N pada suhu 70°C selama 30 menit. Setelah itu hasil hidrolisis disuntikkan ke dalam KCKT pada kondisi analisis terpilih, yakni dengan menggunakan kolom penukar kation kuat Supelcosil LC-SCX; suhu kolom 30°C; fase gerak amonium fosfat dengan kondisi akhir amonium fosfat 40 mM; pH 3,00; laju alir 1,5 mL/menit; detektor fluoresensi pada panjang gelombang eksitasi 286 nm dan emisi 366 nm; volume penyuntikan 20,0 µL. Gambar kromatogram DNA sebelum dan setelah dihidrolisis dapat dilihat pada Gambar 4.14 dan 4.15.

Dari keseluruhan DNA yang diisolasi, terdapat satu kali DNA gagal diisolasi yaitu pada pemberian 0,5 kali LD₅₀ NaNO₂ dan dimetilamin dengan waktu pengambilan darah pada t = 2 jam. Ketika ditambahkan fenol-kloroform, seharusnya terbentuk supernatan jernih, namun pada DNA ini supernatan tidak terbentuk, dan setelah berulang kali diulangi dengan penambahan fenol-kloroform, supernatan jernih tetap tidak terbentuk. Hal ini mungkin dikarenakan kegagalan dari pengisolasian sel darah putih ketika dilisis dengan larutan pelisis.

Hasil dari pemberian prekursor dan nitrosodimetilamin adalah tidak ditemukan adanya *adduct* DNA. Hal ini mungkin disebabkan oleh beberapa hal. Pertama, kemungkinan N⁷-metilguanin dan O⁶- metilguanin sudah terbentuk,

namun dengan konsentrasi di bawah batas deteksi metode sehingga N⁷-metilguanin dan O⁶-metilguanin yang terbentuk tidak terdeteksi.

Kedua, kurangnya seri percobaan menyebabkan jumlah N⁷-metilguanin dan O⁶-metilguanin belum terbentuk ataupun belum cukup untuk dapat terdeteksi. Kurangnya seri percobaan dapat dikarenakan percobaan masih kurang lama untuk membentuk *adduct* DNA. Pembentukan *adduct* DNA memiliki kecenderungan yang berbeda-beda dalam menyebabkan mutasi yang bergantung pada kekompleksan dari gugus alkil yang terikat. Semakin kompleks gugus yang terikat, maka semakin besar kecenderungan *adduct* tersebut untuk menyebabkan mutasi (Venitt & Parry, 1984). Mutasi yang terjadi merupakan awal proses karsinogenesis, sehingga pendeteksian terjadinya mutasi merupakan deteksi awal terjadinya kanker.

Proses terjadinya mutasi, secara garis besar terbagi menjadi 3 *stages*, inisiasi, promosi dan progresi seperti halnya proses karsinogenesis. Sel terinisiasi dapat tetap ada sepanjang hidup inangnya. Jika inangnya secara berulang terpapar oleh promotor tumor, inilah yang dapat menyebabkan pertumbuhan sel menghasilkan tumor ganas (Smart, 2004). Dari hal ini diketahui bahwa semakin sering terpapar zat karsinogen, maka semakin besar kemungkinan timbulnya *adduct*. Selain itu, diketahui bahwa dosis nitrosodimetilamin 30 mg/kg telah lengkap dimetabolisme dalam waktu 6 jam. Hal ini mungkin dapat menyebabkan kurangnya seri pemberian prekursor dan nitrosodimetilamin dalam waktu satu hari, mungkin prekursor ataupun nitrosodimetilamin tidak hanya diberikan sekali, tetapi 2 atau 3 kali dalam sehari.

Ketiga, adanya sistem perbaikan sendiri di dalam tubuh tikus untuk DNA yang teralkilasi. Proses perbaikan DNA yang teralkilasi dapat dilakukan dengan cara transfer langsung grup alkil dari DNA ke protein *repair*, yang menyebabkan kehilangan fungsi dari protein, sehingga basa termodifikasi akan terlepas dengan glikosilase meninggalkan *site apurinic* atau *apirimidinic*. *Strand* DNA kemudian dipotong dan dihilangkan oleh endonuklease, dan meninggalkan *strand* utuh sebagai *template* DNA baru, setelah itu akan diligase untuk melengkapi proses perbaikan (Saffhill, Margison, & O'Connor, 1985).

Untuk perbaikan *adduct* O⁶-metilguanin, diperkirakan dapat dilakukan oleh enzim O⁶-alkilguanin DNA-alkiltransferase (AGT) yang secara alami bekerja secara aktif sehingga dapat memindahkan gugus alkil seperti metil dari O⁶-metilguanin ke residu sistein. Enzim AGT merupakan enzim yang melepaskan *adduct* O⁶-metilguanin secara ireversibel, sehingga paparan senyawa karsinogen yang tinggi dapat menurunkan aktivitas enzim perbaikan dengan menghabiskan penyimpanan enzim perbaikan (Reh, 2000). Sedangkan N⁷-metilguanin merupakan *adduct* yang bersifat kurang stabil, di mana dalam bentuk untai ganda DNA mempunyai $t_{1/2}$ 2 – 150 jam dengan cara kehilangan C8 proton, depurinasi dan hidrolisis ikatan N-alkyl (Boysen, Pachkowski, Nakamura, & Swenberg, 2009). Data hasil tikus uji dapat dilihat pada Tabel 4.18.

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

BAB 5

KESIMPULAN DAN SARAN

5.1 Kesimpulan

- 5.1.1 Kondisi optimum untuk analisis N⁷-metilguanin dan O⁶-metilguanin yang digunakan dalam penelitian ini adalah Kromatografi Cair Kinerja Tinggi (KCKT) dengan kolom penukar kation kuat Supelcosil LC-SCX (5 µm, 250 x 4,6 mm), fase gerak amonium fosfat dengan konsentrasi akhir amonium fosfat 40 mM, pH 3,00, kecepatan alir 1,5 mL/menit, suhu kolom 30°C, dan detektor fluoresensi pada panjang gelombang eksitasi 286 nm dan emisi 366 nm.
- 5.1.2 Tidak terdeteksi adanya N⁷-metilguanin dan O⁶-metilguanin dalam darah tikus selama diberikan natrium nitrit dan dimetilamin per oral dengan dosis 110 mg/kg untuk natrium nitrit dan dimetilamin (1:5) selama pemberian satu minggu dengan kondisi analisis optimal, tetapi verifikasi secara *in vitro* menunjukkan adanya *adduct* O⁶-metilguanin pada waktu retensi 13,208 menit.

5.2 Saran

- 5.2.1 Perlu dikembangkan metode dengan sensitivitas yang lebih tinggi untuk menganalisis *adduct* DNA secara *in vivo*
- 5.2.2 Perlu dilakukan penambahan jangka waktu pemberian dan interval waktu pemberian untuk reaksi *in vivo*
- 5.2.3 Perlu dilakukan pengisolasian DNA dari hati karena nitrosodimetilamin merupakan senyawa hepatokarsinogen

DAFTAR ACUAN

- Abnet, C. C. (2007). Carcinogenic food contaminants. *Cancer Invest*, 25, 189-196.
- Black, J. G. (1999). *Microbiology principles and explorations* (edisi keempat). New Jersey: Prentice Hall.
- Boysen, G., et al. (2009). The formation and biological significance of N⁷-guanine adducts. *Mutation Research*, 678, 76-94.
- Chao, M. R., et al. (2009). Time course evaluation of N-nitrosodialkylamines-induced DNA alkylation and oxidation in liver of mosquito fish. *Mutation Research*, 660, 33-39.
- Departemen Kesehatan Republik Indonesia. (2010). *Jika tidak dikendalikan 26 juta orang di dunia menderita kanker*. 5 Mei 2010. <http://www.depkes.go.id/index.php/component/content/article/43-newsslider/1060-jika-tidak-dikendalikan-26-juta-orang-di-dunia-menderita-kanker-html>
- Department of Health and Human Services. (2001). *Guidance for Industry, Bioanalytical Method Validation*. 15 November 2009. <http://www.fda.gov/downloads/Drugs/GuidanceComplianceRegulatoryInformation/Guidances/UCM070107.pdf>
- Domanska, K., & Kowalski, B. (2002). Effect of different storage conditions on N-nitrosamine content in polish edible offals processed meat products. *Bull. Vet. Inst. Pulawy*, 46, 317-324.
- Engelhardt, H. (1996). *Application of HPLC to Separation of Metabolic of Nucleic Acids in Physiological Fluids*. Berlin: Springer-Verlag.
- Farmakope Indonesia* (edisi keempat). (1995). Jakarta: Departemen Kesehatan Republik Indonesia
- Gandjar, I. G., & Rohman, A. (2007). *Kimia farmasi analisis*. Yogyakarta: Pustaka Pelajar.

- Harahap, Y., Hayun, & Irawati. (2008). Analysis of adduct which is formed from reaction between cyclophosphamide with guanine and calf thymus DNA in vitro by high performance liquid chromatography-strong cation exchange. *Proceeding International Symposium on Molecular Targeted Drug Therapy*, (hal. 154-162).
- Harahap, Y., Suryadi, H., & Winandar, T. (2004). Analisis Guanin, N7-metilguanin dan O6-metilguanin secara kromatografi cair kinerja tinggi-penukar kation kuat. *ACTA Pharmaceutical*, XXIV, 5.
- Harmita. (2006). *Buku ajar analisis fisikokimia*. Depok: Departemen Farmasi FMIPA Universitas Indonesia.
- Herron, D. C., & Shank, R. (1979). Quantitative high-pressure liquid chromatographic analysis of methylated purines in DNA of rats treated with chemical carcinogens. *Analytical Biochemistry*, 100, 58-63.
- Hoff, D. Y., & Van, D. (1993). Molecular Biology for the Oncologist. Dalam P. Calabresi, & P. S. Schein, *Medical Oncology* (edisi kedua, hal. 3-5). Health Professionis division Mc. Graw-Hill, Inc.
- International Agency for Research on Cancer. (2004). *Other data relevant to an evaluation of carcinogenicity*. 5 Januari 2010. <http://monographs.iarc.fr/ENG/Monographs/vol91/mono91-6D.pdf>
- International agency for research on cancer. (2006). *Ingested nitrates and nitrites volume 94*. 9 November 2009. <http://monographs.iarc.fr/ENG/Meetings/94-nitratenitrite.pdf>
- International Union Against Cancer. (2010). *Cancer can be prevented too*. 5 Mei 2010. <http://www.worldcancercampaign.org/>
- Johnson, E. C., & Stevenson, R. (1991). *Dasar Kromatografi Cair*. Bandung: Penerbit ITB.
- Liteplo, R., Meek, M., & Windle, W. (2002). N-Nitrosodimethylamine. *Concise International Chemical Assessment Document 38*. Genewa.
- Moller, H. e. (1989). Endogenous nitrosation in relation to nitrate exposure from drinking water and diet in a Danish rural population. *Journal of Cancer Research*, 49, 3117-3121.
- Natalia, L. (2009). Analisis O⁶-alkilguanin dalam darah pasien kanker payudara di rumah sakit kanker "Dharmais" yang mendapatkan regimen siklofosamid. Skripsi Program S1 Farmasi UI, Depok: 1-124.

- National Institutes of Health. (2004). *DNA preparation from blood*. 2 Januari 2010.
http://www.riedlab.nci.nih.gov/publications/2438.2413_DNA_Prep_Blood.pdf
- Poirer, M. C., Santella, R. M., & Weston, A. (2000). Carcinogen macromolecular adducts and their measurement. *Carcinogenesis*, *21*, 353-359.
- Poirier, M. C., & Beland, F. A. (1994). DNA adduct measurements and tumor incidence during chronic carcinogen exposure in rodents. *Environmental Health Perspectives*, *102*, 161-165.
- Putri, A. K. (2009). Pengaruh pemberian vitamin C terhadap pembentukan nitrosodimetilamin pada mencit jantan setelah pemberian natrium nitrit dan dimetilamin. Skripsi Program S1 Farmasi UI, Depok: 1-83.
- Reh, B. D. (2000). O⁶-Methylguanine DNA adducts associated with occupational nitrosamine exposure. *Carcinogenesis*, *21*, 29-33.
- Rostkowska, K., Zwierz, K., Rozanski, A., Moniuszko-Jakoniuk, J., & Roszczenko, A. (1998). Formation and metabolism of N-Nitrosamines. *Polish Journal of Environmental Studies*, *7*, 321-325.
- Saffhill, R., Margison, G., & O'Connor, P. (1985). Mechanisms of carcinogenesis induced by alkylating agent. *Biochimica et Biophysica Acta*, *823*, 111-145.
- Sambrook, J., Fritsch, E. F., & Maniatis, T. (1989). *Molecular cloning, a laboratory manual* (edisi kedua, Vol. 3). New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- Sari, N. (2008). Analisis O⁶-alkilguanin dalam darah tikus selama pemberian berulang siklofosfamid per oral. Skripsi Program S1 Farmasi UI, Depok: 1-113.
- Scott, R. P. (2003). *Liquid chromatography detector*. 25 Mei 2010:
<http://www.library4science.com/>
- Skoog, D. A. (1991). *Fundamentals of analytical chemistry* (edisi ketujuh). Philadelphia: Saunders college.
- Smart, R. C. (2004). Chemical carcinogenesis. Dalam E. Hodgson, *A textbook of Modern Toxicology* (edisi ketiga, hal. 225 - 250). John Wiley & Sons.
- Souliotis, V. L. (2002). DNA adducts and liver DNA replication in rats during chronic exposure to N-nitrosodimethylamine (NDMA) and their relationships to the dose-dependence of NDMA hepatocarcinogenesis. *Mutation Research*, *500*, 75-87.

Souliotis, V. L., et al. (1995). Dosimetry of O⁶-methylguanine in rat DNA after low-dose, chronic exposure N-nitrosodimethylamine (NDMA). *Carcinogenesis*, 16, 2381-2387.

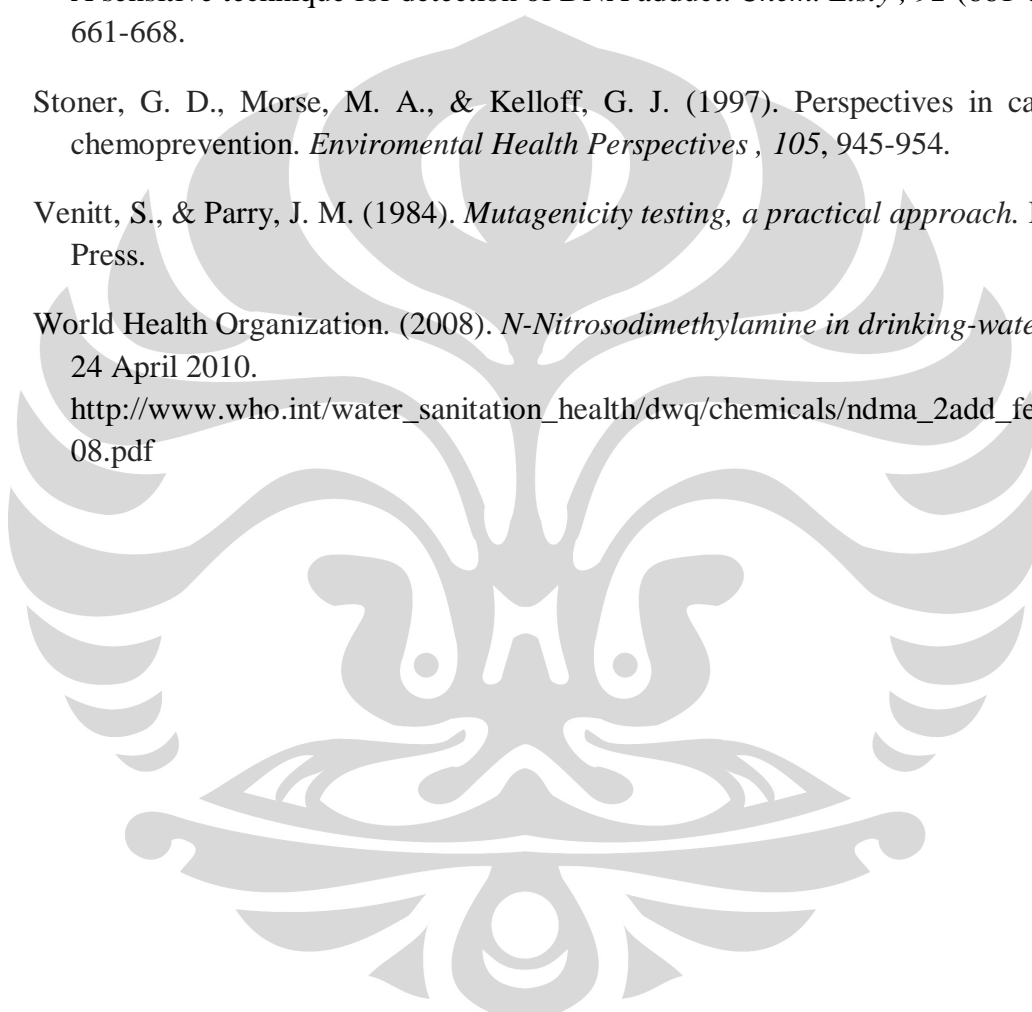
Speijers, G., & Van den Brandt, P. (2009). *Nitrite and potential endogenous formation of N-nitroso compound*. 22 November 2009, dari <http://www.inchem.org/documents/jecfa/jecmono/v50je05.htm>

Stiborova, M., Frei, E., Bieler, C. A., & Schmeiser, H. (1998). ³²P-Post labelling: A sensitive technique for detection of DNA adduct. *Chem. Listy*, 92 (661-668), 661-668.

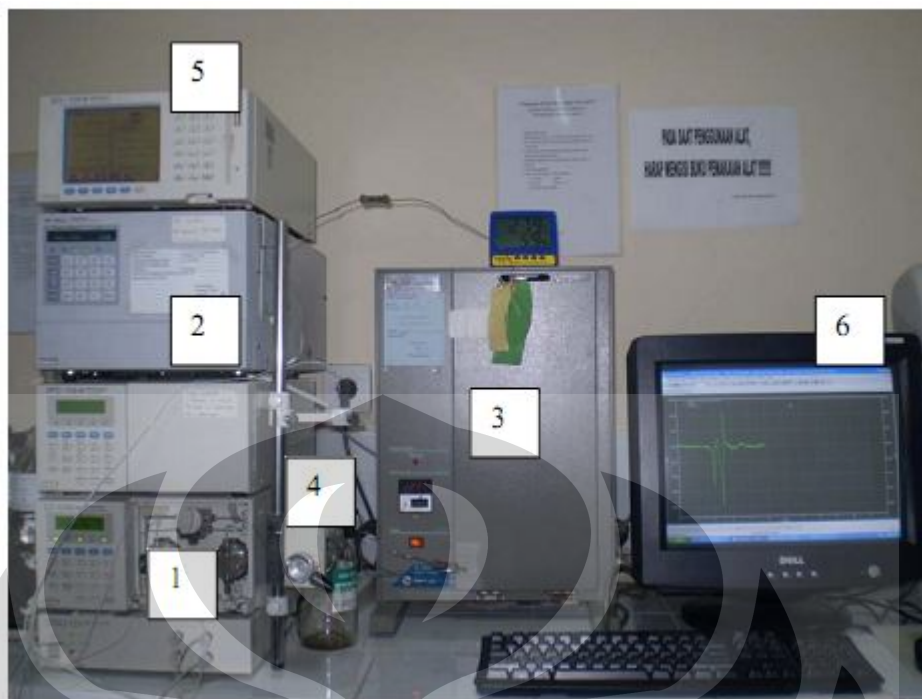
Stoner, G. D., Morse, M. A., & Kelloff, G. J. (1997). Perspectives in cancer chemoprevention. *Environmental Health Perspectives*, 105, 945-954.

Venitt, S., & Parry, J. M. (1984). *Mutagenicity testing, a practical approach*. IRL Press.

World Health Organization. (2008). *N-Nitrosodimethylamine in drinking-water*. 24 April 2010.
http://www.who.int/water_sanitation_health/dwq/chemicals/ndma_2add_feb2008.pdf



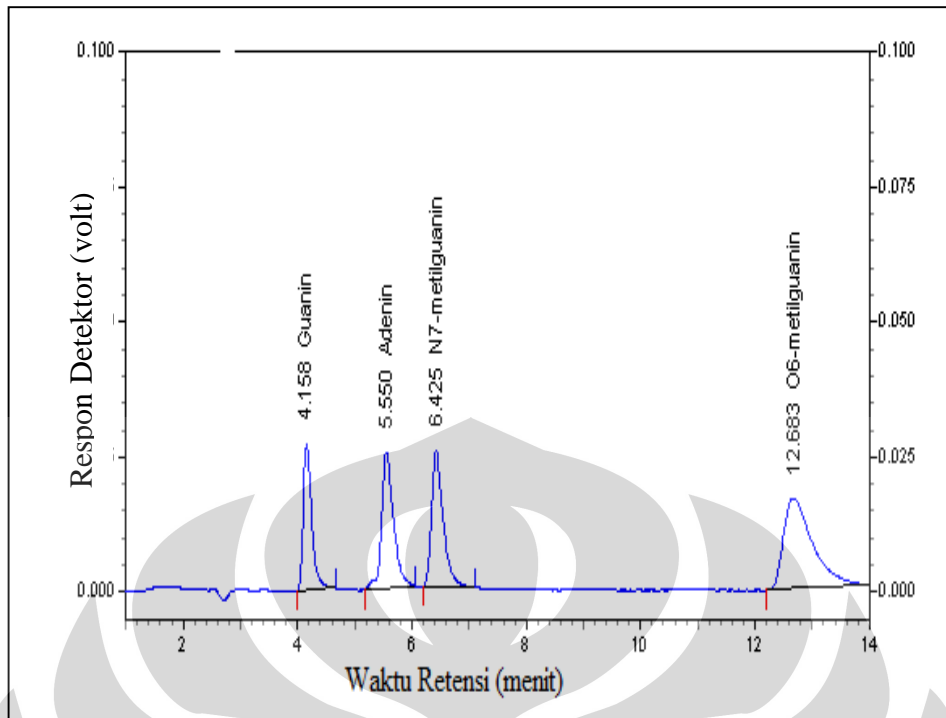




Keterangan :

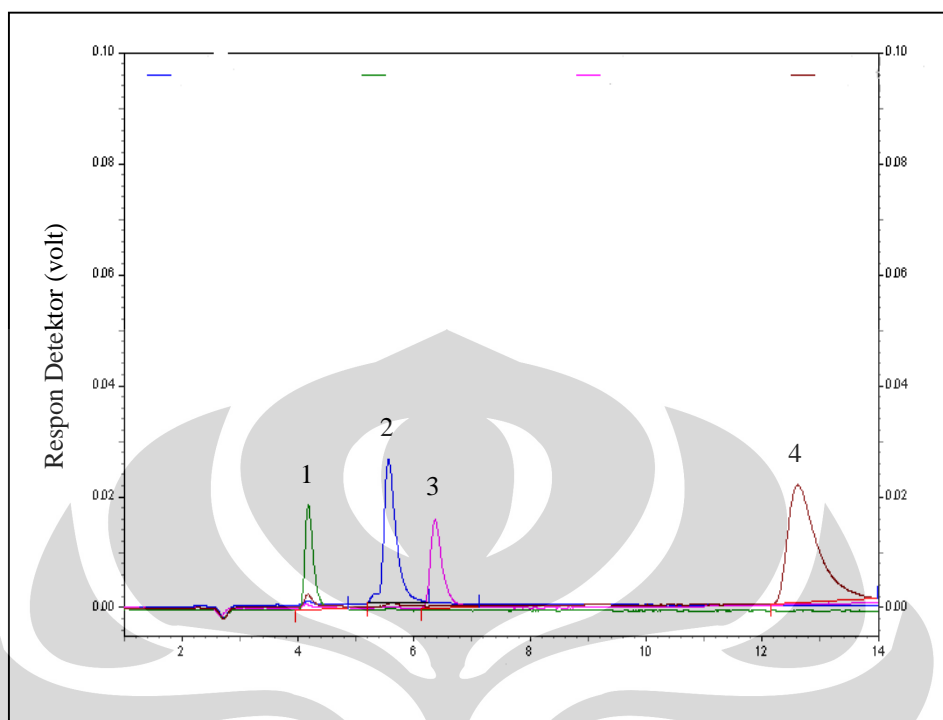
- (1) Pompa (Shimadzu LC-10AD vp);
- (2) Detektor fluoresensi (Shimadzu RF-10A xl);
- (3) Oven kolom (TC 1900) (kolom Supelcosil LC-SCX 5 μ m, 250 x 4,6 mm terdapat di dalam oven kolom);
- (4) Injection port;
- (5) System controller (Shimadzu SCL-10A vp);
- (6) Rekorder (Shimadzu Class-VP)

Gambar 4.1 Instrumentasi KCKT



Kondisi analisis: kolom penukar kation kuat (Supelcosil®LC-SCX, 5 μ m, 250 x 4,6 mm); suhu kolom 30°C; fase gerak amonium fosfat dengan konsentrasi akhir 40 mM; pH 3,00; kecepatan alir 1,5 ml/menit; detektor fluoresensi pada panjang gelombang eksitasi 286 nm dan emisi 366 nm; volume penyuntikan 20 μ l

Gambar 4.2 Kromatogram campuran larutan standar guanin; adenin; N⁷-metilguanin dan O⁶-metilguanin dalam asam klorida 0,1 N

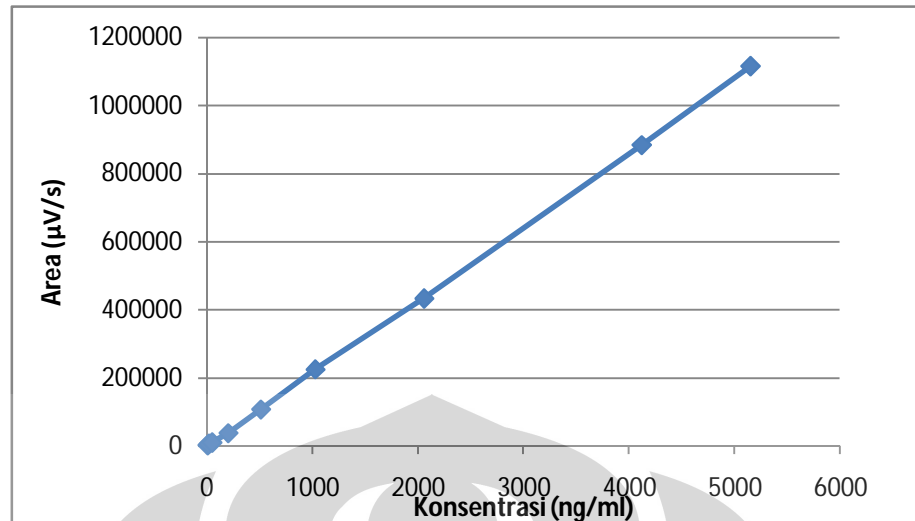


Keterangan:

Waktu retensi Guanin (1) = 4,175 menit
Waktu retensi Adenin (2) = 5,567 menit
Waktu retensi N⁷-metilguanin (3) = 6,367 menit
Waktu retensi O⁶-metilguanin (4) = 12,608 menit

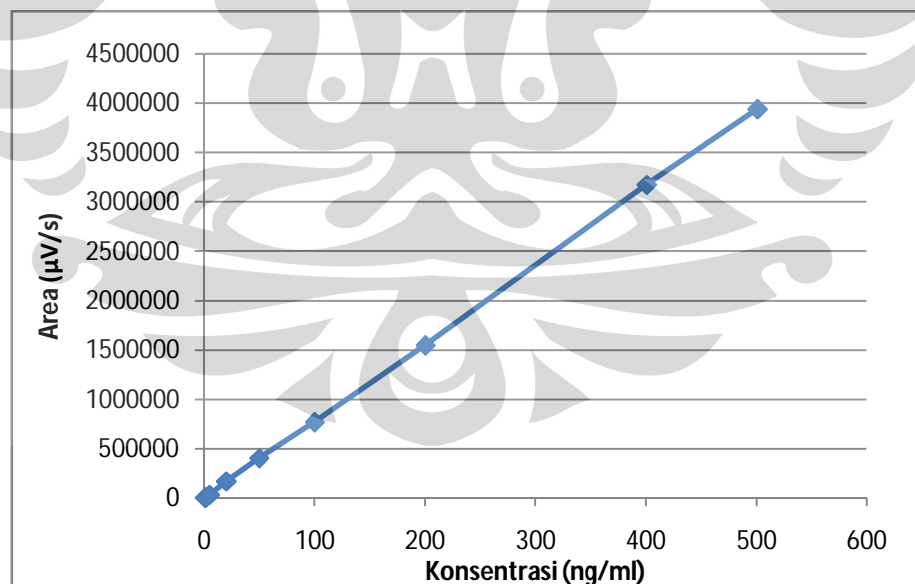
Kondisi analisis: kolom penukar kation kuat (Supelcosil®LC-SCX, 5 µm, 250 x 4,6 mm); suhu kolom 30°C; fase gerak amonium fosfat dengan konsentrasi akhir 40 mM; pH 3,00; kecepatan alir 1,5 ml/menit; detektor fluoresensi pada panjang gelombang eksitasi 286 nm dan emisi 366 nm; volume penyuntikan 20 µl

Gambar 4.3 Kromatogram larutan standar guanin (hijau); adenin (biru); N⁷-metilguanin (pink); O⁶-Metilguanin (coklat) dalam asam klorida 0,1 N



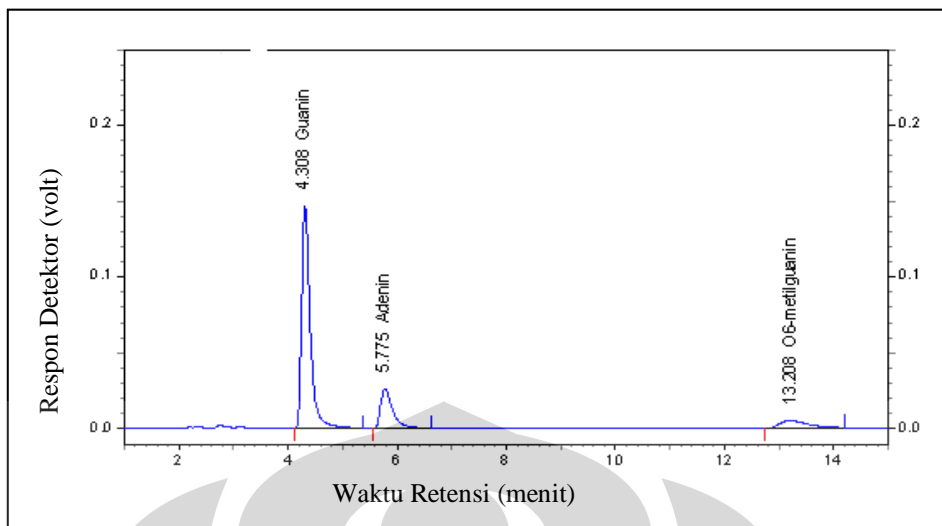
Kondisi analisis: kolom penukar kation kuat (Supelcosil® LC-SCX, 5 µm, 250 x 4,6 mm); suhu kolom 30°C; fase gerak amonium fosfat 40 mM; pH 3,00; kecepatan alir 1,5 ml/menit; detektor fluoresensi pada panjang gelombang eksitasi 286 nm dan emisi 366 nm; konsentrasi 0,1 µg/ml; volume penyuntikan 20 µl

Gambar 4.4 Kuva kalibrasi standar N⁷-metilguanin



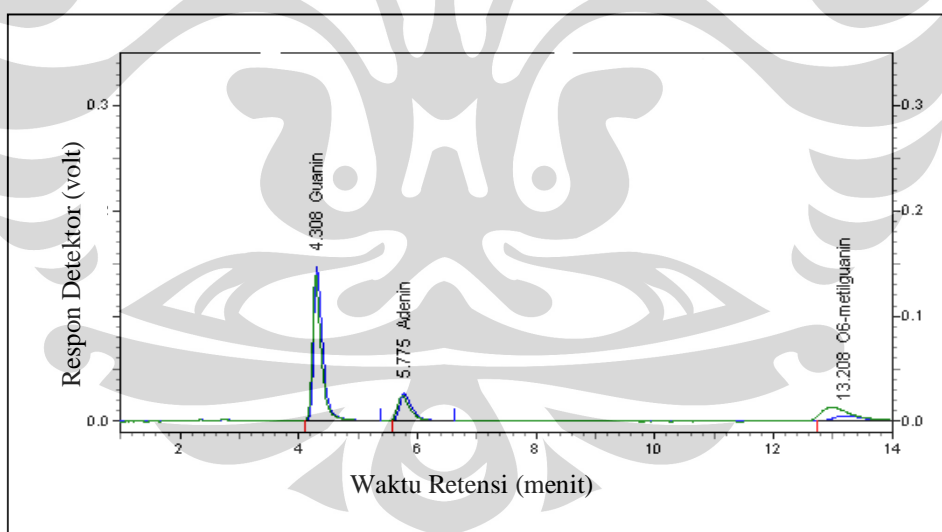
Kondisi analisis: kolom penukar kation kuat (Supelcosil® LC-SCX, 5 µm, 250 x 4,6 mm); suhu kolom 30°C; fase gerak amonium fosfat 40 mM; pH 3,00; kecepatan alir 1,5 ml/menit; detektor fluoresensi pada panjang gelombang eksitasi 286 nm dan emisi 366 nm; konsentrasi 0,1 µg/ml; volume penyuntikan 20 µl

Gambar 4.5 Kurva kalibrasi standar O⁶-metilguanin



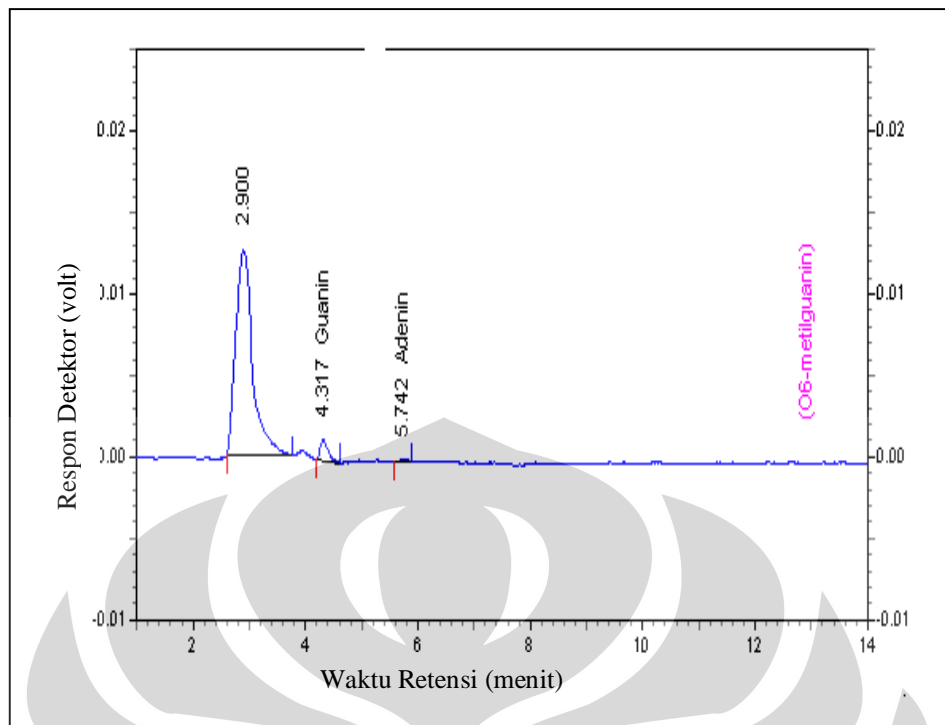
Kondisi analisis: kolom penukar kation kuat (Supelcosil®LC-SCX, 5 μ m, 250 x 4,6 mm); suhu kolom 30°C; fase gerak amonium fosfat dengan konsentrasi akhir 40 mM; pH 3,00; kecepatan alir 1,5 ml/menit; detektor fluoresensi pada panjang gelombang eksitasi 286 nm dan emisi 366 nm; volume penyuntikan 20 μ l

Gambar 4.6 Kromatogram endapan hasil reaksi DNA dengan 0,751 ml nitrosodimetilamin dalam dapar Tris-HCl 0,01 M pH 7,5 *in vitro*, setelah inkubasi selama 10 jam dan dihidrolisis dengan asam klorida 0,1 N pada suhu 70°C selama 30 menit



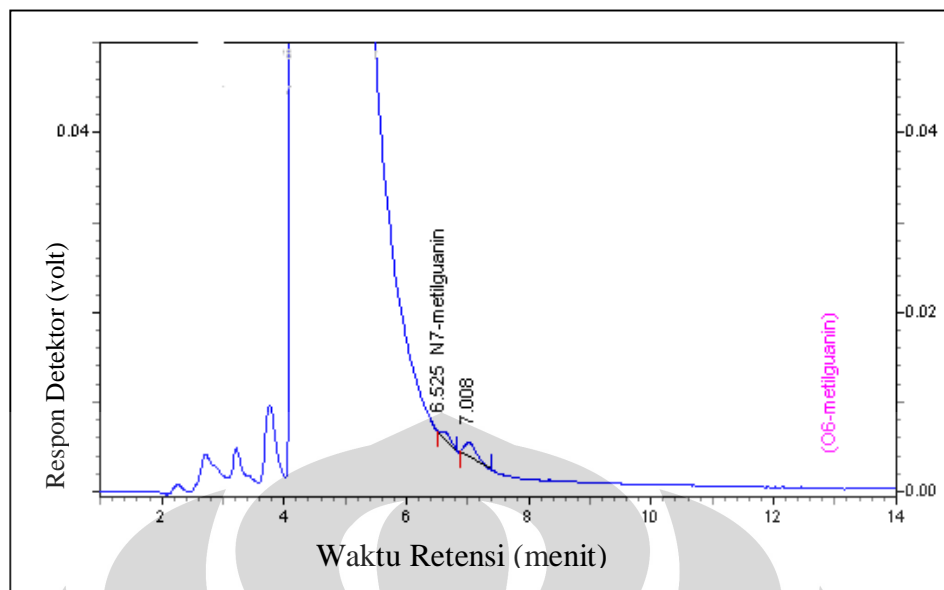
Kondisi analisis: kolom penukar kation kuat (Supelcosil®LC-SCX, 5 μ m, 250 x 4,6 mm); suhu kolom 30°C; fase gerak amonium fosfat dengan konsentrasi akhir 40 mM; pH 3,00; kecepatan alir 1,5 ml/menit; detektor fluoresensi pada panjang gelombang eksitasi 286 nm dan emisi 366 nm; volume penyuntikan 20 μ l

Gambar 4.7 Kromatogram endapan hasil reaksi DNA dengan 0,751 ml nitrosodimetilamin dalam 1,0 ml dapar Tris-HCl 0,01 M pH 7,5 *in vitro*, setelah inkubasi selama 10 jam dan dihidrolisis dengan asam klorida 0,1 N pada suhu 70°C selama 30 menit, setelah dilakukan spiking



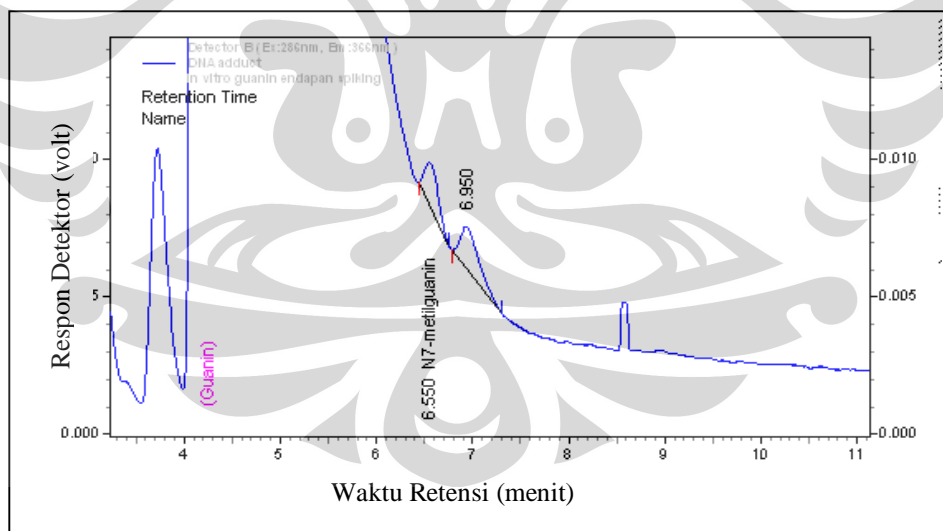
Kondisi analisis: kolom penukar kation kuat (Supelcosil®LC-SCX, 5 μ m, 250 x 4,6 mm); suhu kolom 30°C; fase gerak amonium fosfat dengan konsentrasi akhir 40 mM; pH 3,00; kecepatan alir 1,5 ml/menit; detektor fluoresensi pada panjang gelombang eksitasi 286 nm dan emisi 366 nm; volume penyuntikan 20 μ l

Gambar 4.8 Kromatogram supernatan hasil reaksi DNA dengan 0,751 ml nitrosodimetilamin dalam 1,0 ml dapar Tris-HCl 0,01 M pH 7,5 *in vitro*, setelah inkubasi selama 10 jam dan dihidrolisis dengan asam klorida 0,1 N pada suhu 70°C selama 30 menit



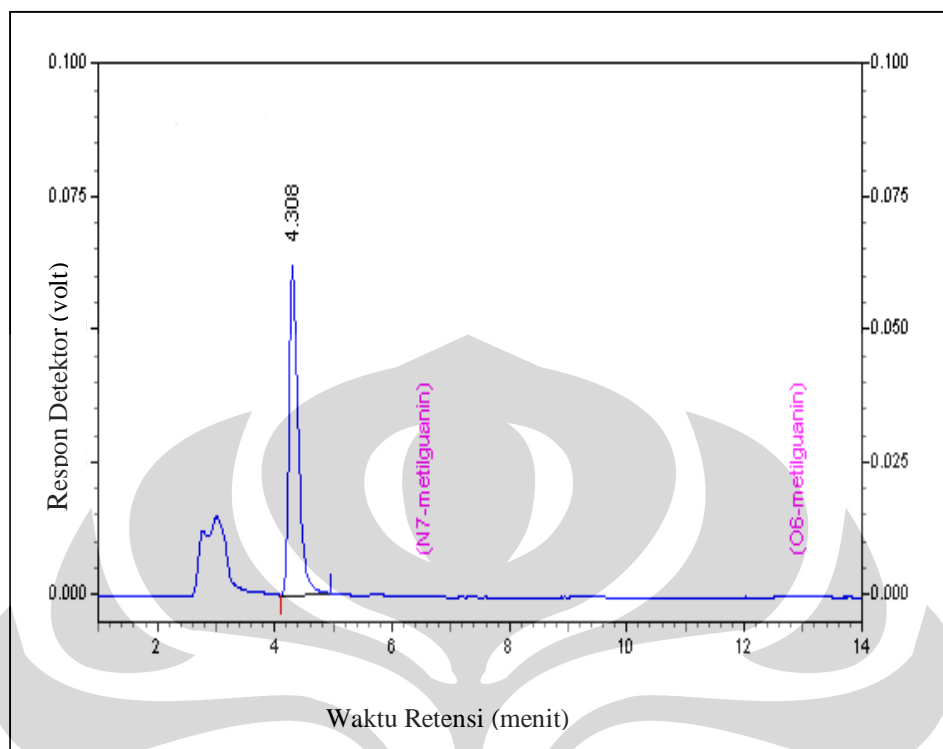
Kondisi analisis: kolom penukar kation kuat (Supelcosil®LC-SCX, 5 μm , 250 x 4,6 mm); suhu kolom 30°C; fase gerak amonium fosfat dengan konsentrasi akhir 40 mM; pH 3,00; kecepatan alir 1,5 ml/menit; detektor fluoresensi pada panjang gelombang eksitasi 286 nm dan emisi 366 nm; volume penyuntikan 20 μl

Gambar 4.9 Kromatogram endapan hasil reaksi 5 mg guanin dalam KH_2PO_4 dengan 0,751 ml nitrosodimetilamin dalam 1,0 ml dapar Tris-HCl 0,01 M pH 7,5 *in vitro*, setelah inkubasi selama 6 jam dan dihidrolisis dengan asam klorida 0,1 N pada suhu 70°C selama 30 menit



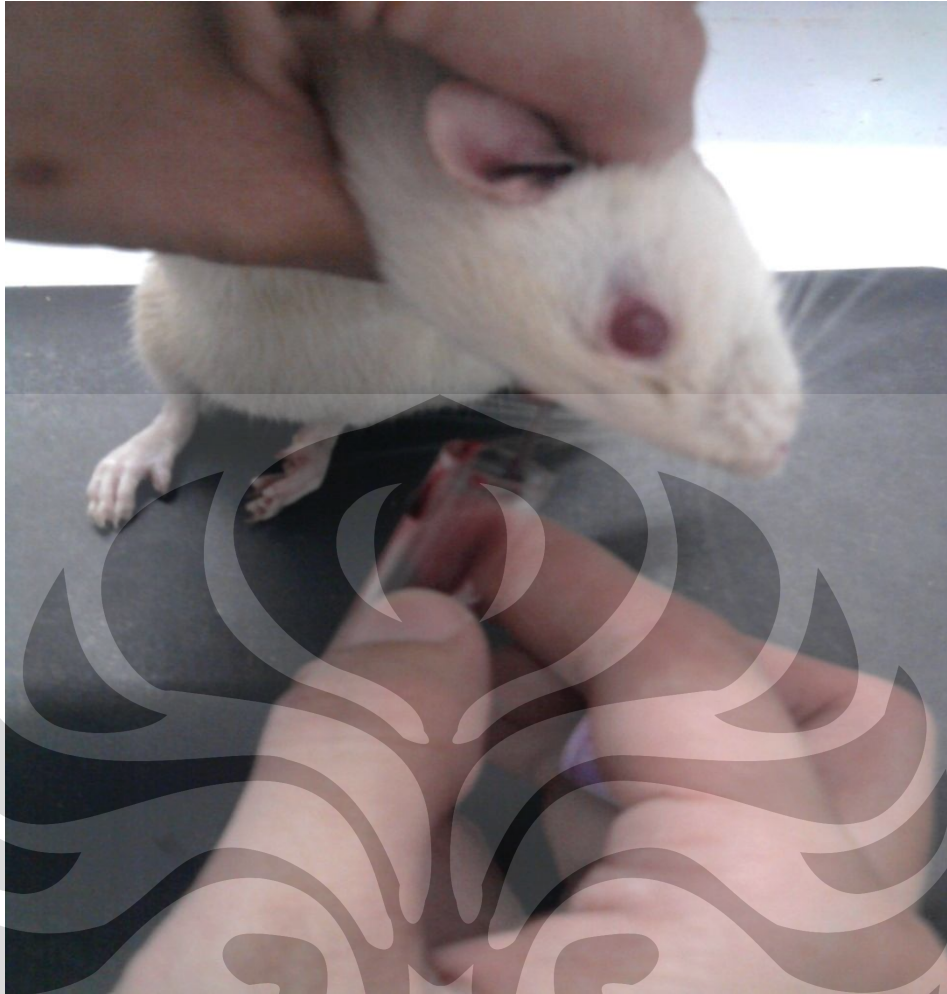
Kondisi analisis: kolom penukar kation kuat (Supelcosil®LC-SCX, 5 μm , 250 x 4,6 mm); suhu kolom 30°C; fase gerak amonium fosfat dengan konsentrasi akhir 40 mM; pH 3,00; kecepatan alir 1,5 ml/menit; detektor fluoresensi pada panjang gelombang eksitasi 286 nm dan emisi 366 nm; volume penyuntikan 20 μl

Gambar 4.10 Kromatogram endapan hasil reaksi 5 mg guanin dalam KH_2PO_4 dengan 0,751 ml nitrosodimetilamin dalam 1,0 ml dapar Tris-HCl 0,01 M pH 7,5 *in vitro*, setelah inkubasi selama 6 jam dan dihidrolisis dengan asam klorida 0,1 N pada suhu 70°C selama 30 menit setelah spiking



Kondisi analisis: kolom penukar kation kuat (Supelcosil®LC-SCX, 5 μm , 250 x 4,6 mm); suhu kolom 30°C; fase gerak amonium fosfat dengan konsentrasi akhir 40 mM; pH 3,00; kecepatan alir 1,5 ml/menit; detektor fluoresensi pada panjang gelombang eksitasi 286 nm dan emisi 366 nm; volume penyuntikan 20 μl

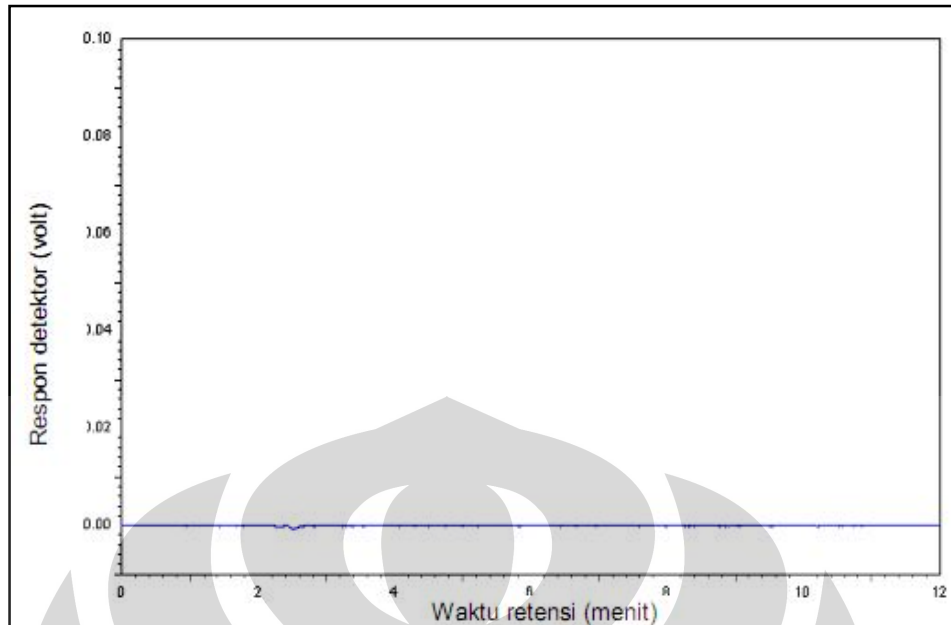
Gambar 4.11 Kromatogram supernatan hasil reaksi 5 mg guanin dalam KH_2PO_4 dengan 0,751 ml nitrosodimetilamin dalam 1,0 ml dapar Tris-HCl 0,01 M pH 7,5 *in vitro*, setelah inkubasi selama 6 jam dan dihidrolisis dengan asam klorida 0,1 N pada suhu 70°C selama 30 menit



Gambar 4.12 Pengambilan darah dari tikus melalui *sinus orbital* mata

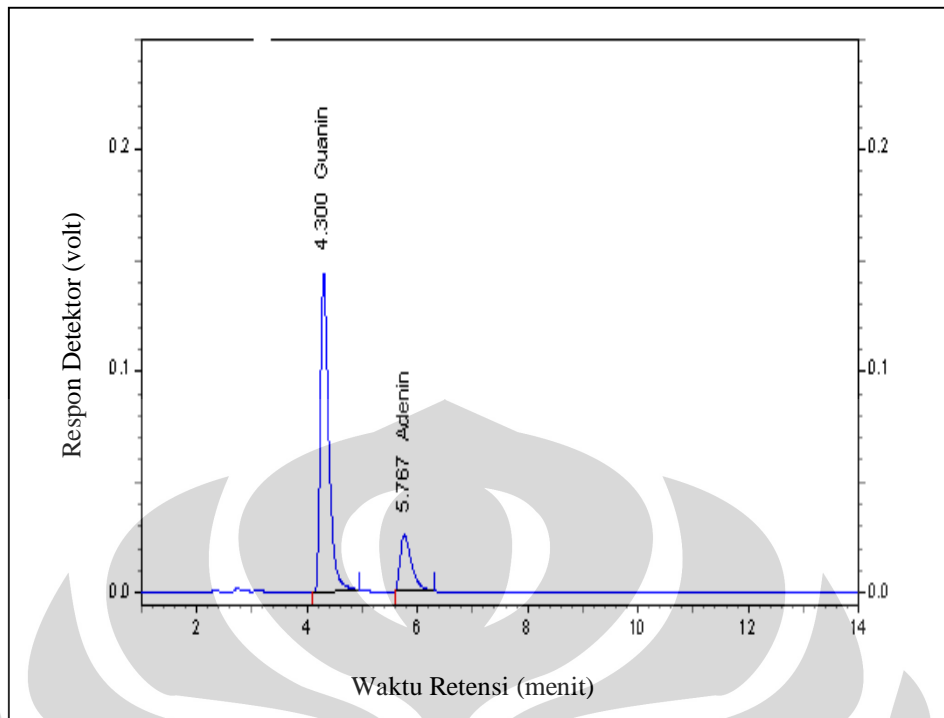


Gambar 4.13 Hasil isolasi DNA



Kondisi analisis: kolom penukar kation kuat (Supelcosil®LC-SCX, 5 μ m, 250 x 4,6 mm); suhu kolom 30°C; fase gerak amonium fosfat dengan konsentrasi akhir 40 mM; pH 3,00; kecepatan alir 1,5 ml/menit; detektor fluoresensi pada panjang gelombang eksitasi 286 nm dan emisi 366 nm; volume penyuntikan 20 μ l

Gambar 4.14 Kromatogram DNA hasil isolasi dari sampel darah tikus dalam 100 μ l aquadest (tanpa hidrolisis)



Kondisi analisis: kolom penukar kation kuat (Supelcosil®LC-SCX, 5 μ m, 250 x 4,6 mm); suhu kolom 30°C; fase gerak amonium fosfat dengan konsentrasi akhir 40 mM; pH 3,00; kecepatan alir 1,5 ml/menit; detektor fluoresensi pada panjang gelombang eksitasi 286 nm dan emisi 366 nm; volume penyuntikan 20 μ l

Gambar 4.15 Kromatogram DNA hasil isolasi dari sampel darah tikus dalam 100 μ l aquadest, disertai hidrolisis dengan asam klorida 0,1 N pada suhu 70°C selama 30 menit



Tabel 4.1 Data waktu retensi (t_R), jumlah lempeng teoritis (N), HETP dan resolusi (R) kromatogram campuran guanin, adenin, N⁷-metilguanin dan O⁶-metilguanin pada fase gerak amonium fosfat dengan konsentrasi 60 mM

No.	Nama senyawa	Waktu retensi (menit)	Resolusi	N (Pelat teoritis)	HETP (cm/pelat teoritis)
1	Guanin	3,075	0	3241,32	0,000771291
2	Adenin	3,825	2,9	2590,72	0,000964983
3	N ⁷ -metilguanin	4,45	2,19	4336,25	0,000576535
4	O ⁶ -metilguanin	8	7,31	2085,27	0,001198886

Kondisi analisis: kolom penukar kation kuat (Supelcosil® LC-SCX, 5 μ m, 250 x 4,6 mm); suhu kolom 30°C; kecepatan alir 1,5 ml/menit; detektor fluoresensi pada panjang gelombang eksitasi 286 nm dan emisi 366 nm; konsentrasi 0,1 μ g/ml; volume penyuntikan 20 μ l

Tabel 4.2 Data waktu retensi (t_R), jumlah lempeng teoritis (N), HETP dan resolusi (R) kromatogram campuran guanin, adenin, N⁷-metilguanin dan O⁶-metilguanin pada fase gerak amonium fosfat dengan konsentrasi 50 mM

No.	Nama senyawa	Waktu retensi (menit)	Resolusi	N (Pelat teoritis)	HETP (cm/pelat teoritis)
1	Guanin	3,092	0	2721,79	0,000918513
2	Adenin	3,875	2,88	2546,4	0,000981778
3	N ⁷ -metilguanin	4,492	2	3338,65	0,000748806
4	O ⁶ -metilguanin	7,967	6,92	2109,56	0,001185081

Kondisi analisis: kolom penukar kation kuat (Supelcosil® LC-SCX, 5 μ m, 250 x 4,6 mm); suhu kolom 30°C; kecepatan alir 1,5 ml/menit; detektor fluoresensi pada panjang gelombang eksitasi 286 nm dan emisi 366 nm; konsentrasi 0,1 μ g/ml; volume penyuntikan 20 μ l

Tabel 4.3 Data waktu retensi (t_R), jumlah lempeng teoritis (N), HETP dan Resolusi (R) kromatogram campuran guanin, adenin, N⁷-metilguanin dan O⁶-metilguanin pada fase gerak amonium fosfat dengan konsentrasi 40 mM

No.	Nama senyawa	Waktu retensi (menit)	Resolusi	N (Pelat teoritis)	HETP (cm/pelat teoritis)
1	Guanin	4,158	0	4078,64	0,0000612949
2	Adenin	5,55	4,48	3783,87	0,0000660699
3	N ⁷ -metilguanin	6,425	2,41	4984,68	0,0000501537
4	O ⁶ -metilguanin	12,683	9,89	3169,22	0,0000788838

Kondisi analisis: kolom penukar kation kuat (Supelcosil® LC-SCX, 5 μ m, 250 x 4,6 mm); suhu kolom 30°C; kecepatan alir 1,5 ml/menit; detektor fluoresensi pada panjang gelombang eksitasi 286 nm dan emisi 366 nm; konsentrasi 0,1 μ g/ml; volume penyuntikan 20 μ l

Tabel 4.4 Hasil pengukuran uji kesesuaian sistem N⁷-metilguanin

Konsentrasi (ng/ml)	Area (μ V/s)	Tf	N (pelat teoritis)	HETP (cm/pelat teoritis)	KV (%)
1000	246872	1,48	4725,4	0,0000053	0,50
	244890	1,3	4836,61	0,0000052	
	247497	1,41	4918,06	0,0000051	
	247497	1,39	4918,06	0,0000051	
	245302	1,37	4850,96	0,0000052	

Kondisi analisis: kolom penukar kation kuat (Supelcosil® LC-SCX, 5 μ m, 250 x 4,6 mm); suhu kolom 30°C; fase gerak amonium fosfat 40 mM; pH 3,00; kecepatan alir 1,5 ml/menit; detektor fluoresensi pada panjang gelombang eksitasi 286 nm dan emisi 366 nm; konsentrasi 0,1 μ g/ml; volume penyuntikan 20 μ l

Tabel 4.5 Hasil pengukuran uji kesesuaian sistem O⁶-metilguanin

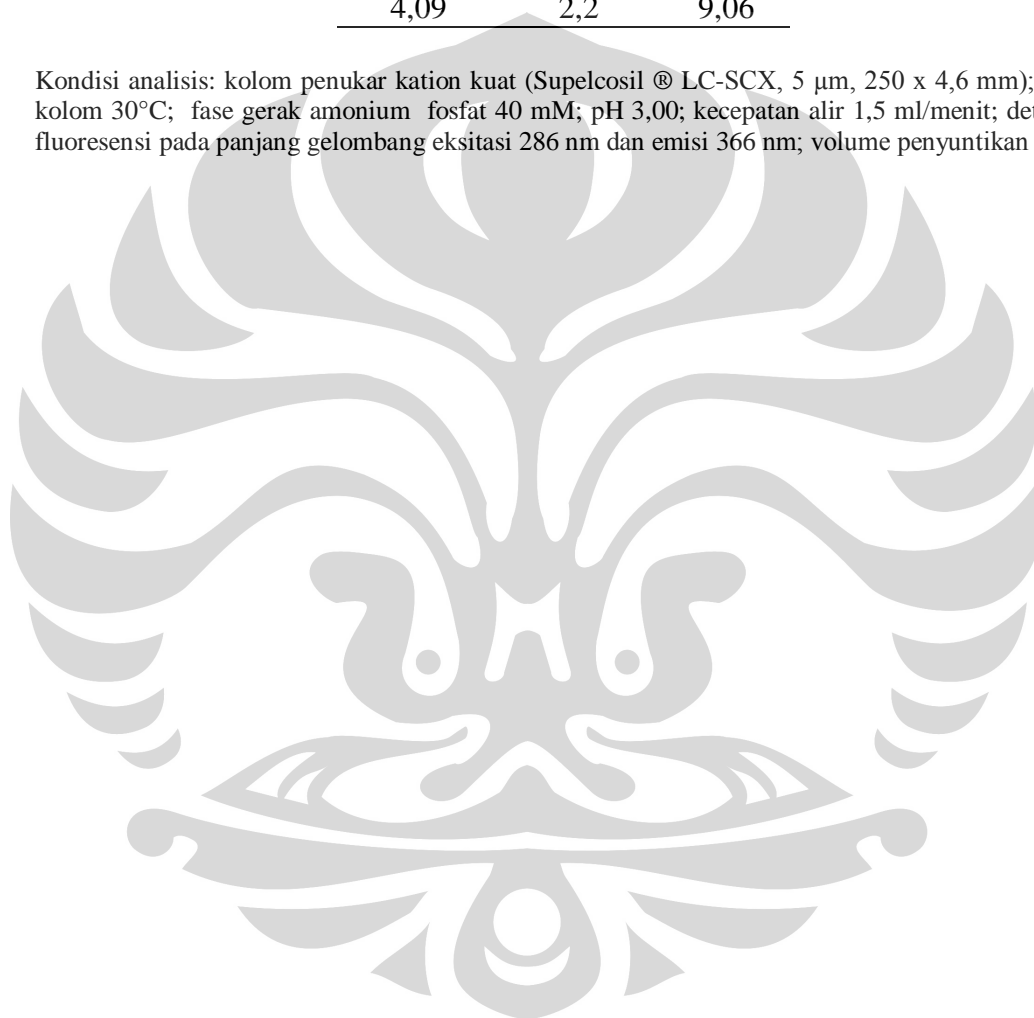
Konsentrasi (ng/ml)	Area (μ V/s)	Tf	N (pelat teoritis)	HETP (cm/pelat teoritis)	KV (%)
100	817359	1,92	2987,53	0,0000084	0,89
	834459	1,89	3022,01	0,0000083	
	821245	1,72	3068,09	0,0000082	
	821245	1,8	3068,09	0,0000082	
	816168	1,79	3057,35	0,0000082	

Kondisi analisis: kolom penukar kation kuat (Supelcosil® LC-SCX, 5 μ m, 250 x 4,6 mm); suhu kolom 30°C; fase gerak amonium fosfat 40 mM; pH 3,00; kecepatan alir 1,5 ml/menit; detektor fluoresensi pada panjang gelombang eksitasi 286 nm dan emisi 366 nm; konsentrasi 0,1 μ g/ml; volume penyuntikan 20 μ l

Tabel 4.6 Hasil pengukuran resolusi (R) kromatogram campuran guanin (1), adenin (2), N⁷-metilguanin(3), O⁶-metilguanin (4), dan untuk uji kesesuaian sistem

R-1-2	R-2-3	R-3-4
4,04	2,22	8,9
4,04	2,22	8,95
4,03	2,2	9,04
4,07	2,16	9,04
4,09	2,2	9,06

Kondisi analisis: kolom penukar kation kuat (Supelcosil® LC-SCX, 5 µm, 250 x 4,6 mm); suhu kolom 30°C; fase gerak amonium fosfat 40 mM; pH 3,00; kecepatan alir 1,5 ml/menit; detektor fluoresensi pada panjang gelombang eksitasi 286 nm dan emisi 366 nm; volume penyuntikan 20 µl



Tabel 4.7 Hasil pengukuran kurva kalibrasi N⁷-metilguanin

No.	Konsentrasi (ng/ml)	Area (μ V/s)
1	10,3	3050
2	20,6	6450
3	51,5	10308
4	206	37838
5	515	107440
6	1030	225339
7	2060	433353
9	4120	883940
10	5150	1115353

$$y = 215,8614x - 2044,38$$

$$R = 0,9999$$

Kondisi analisis: kolom penukar kation kuat (Supelcosil ® LC-SCX, 5 μ m, 250 x 4,6 mm); suhu kolom 30°C; fase gerak amonium fosfat 40 mM; pH 3,00; kecepatan alir 1,5 ml/menit; detektor fluoresensi pada panjang gelombang eksitasi 286 nm dan emisi 366 nm; volume penyuntikan 20 μ l

Tabel 4.8 Hasil pengukuran kurva kalibrasi O⁶-metilguanin

No.	Konsentrasi (ng/ml)	Area (μ V/s)
1	1,002	7750
2	2,004	13479
3	5,01	36192
4	20,04	172401
5	50,1	408029
6	100,2	772764
7	200,4	1549729
9	400,8	3175269
10	501	3942501

$$y = 7877,376x - 1034,14$$

$$R = 0,9999$$

Kondisi analisis: kolom penukar kation kuat (Supelcosil ® LC-SCX, 5 μ m, 250 x 4,6 mm); suhu kolom 30°C; fase gerak amonium fosfat 40 mM; pH 3,00; kecepatan alir 1,5 ml/menit; detektor fluoresensi pada panjang gelombang eksitasi 286 nm dan emisi 366 nm; volume penyuntikan 20 μ l

Tabel 4.9 Hasil pengukuran linearitas N⁷-metilguanin

No.	Konsentrasi (ng/ml) (x)	Area (μV/s) (y)	Area terukur (μV/s) (yi)	Selisih (μV/s) (y-yi) ²	Δx	Δy	Δy/Δx
1	0	0	-1.728,4939	2.987.691,2660	10,3	3050	296,1165049
2	10,3	3050	494,0068	6.533.101,2123	10,3	3400	330,0970874
3	20,6	6450	2.716,5075	13.938.965,9471	30,9	3858	124,8543689
4	51,5	10308	9.384,0097	853.757,9902	154,5	27530	178,1877023
5	206	37838	42.721,5208	23.848.775,1345	309	69602	225,2491909
6	515	107440	109.396,5428	3.828.059,8300	515	117899	228,9300971
7	1030	225339	220.521,5796	23.207.539,4838	1030	208014	201,9553398
8	2060	433353	442.771,6531	88.711.026,1051	2060	450587	218,7315534
9	4120	883940	887.271,8001	11.100.892,0263	1030	231413	224,6728155
10	5150	1115353	1.109.521,8736	34.002.034,7429			
				209.011.843,7382			

Tabel 4.9 (Sambungan)

X	1.462,6000
Sy	5.464,3238
V _{X₀}	1,58 %

Kondisi analisis: kolom penukar kation kuat (Supelcosil ® LC-SCX, 5 µm, 250 x 4,6 mm); suhu kolom 30°C; fase gerak amonium fosfat 40 mM; pH 3,00; kecepatan alir 1,5 ml/menit; detektor fluoresensi pada panjang gelombang eksitasi 286 nm dan emisi 366 nm; volume penyuntikan 20 µl

Tabel 4.10 Hasil pengukuran linearitas O⁶-metilguanin

No.	Konsentrasi (ng/ml) (x)	Area (μV/s) (y)	Area terukur (μV/s) (yi)	Selisih (μV/s) (y-yi) ²	Δx	Δy	Δy/Δx
1	0	0	-2.260,9449	5.111.871,6147	1,002	7.750	7734,530938
2	1,002	7750	5.626,9162	4.507.484,7340	1,002	5.729	5717,56487
3	2,004	13479	13.514,7773	1.280,0146	3,006	22.713	7555,888224
4	5,01	36192	37.178,3605	972.907,0426	15,03	136.209	9062,47505
5	20,04	172401	155.496,2766	285.769.674,4652	30,06	235.628	7838,589488
6	50,1	408029	392.132,1087	252.711.153,5223	50,1	364.735	7280,139721
7	100,2	772764	786.525,1622	189.369.585,5736	100,2	776.965	7754,141717
8	200,4	1549729	1.575.311,2693	654.452.501,7600	200,4	1.625.540	8111,477046
9	400,8	3175269	3.152.883,4834	501.111.352,5714	100,2	767.232	7657,005988
10	501	3942501	3.941.669,5905	691.241,7783			
				1.894.699.053,0767			

Tabel 4.10 (Sambungan)

X	142,2840
Sy	16.452,0908
V _{xo}	1,99 %

Kondisi analisis: kolom penukar kation kuat (Supelcosil ® LC-SCX, 5 µm, 250 x 4,6 mm); suhu kolom 30°C; fase gerak amonium fosfat 40 mM; pH 3,00; kecepatan alir 1,5 ml/menit; detektor fluoresensi pada panjang gelombang eksitasi 286 nm dan emisi 366 nm; volume penyuntikan 20 µl

Tabel 4.11 Hasil pengukuran batas deteksi dan batas kuantitasi N⁷-metilguanin secara statistika

No.	Konsentrasi (ng/ml) (x)	Area (μV/s) (y)	Area terukur (μV/s) (yi)	Selisih (μV/s) (y-yi) ²
1	10,3	3050	178,99242	8242684,524
2	20,6	6450	2402,36484	16383350,39
3	51,5	10308	9072,4821	1526504,481
4	206	37838	42423,0684	21022852,23
5	515	107440	109124,241	2836667,746
6	1030	225339	220292,862	25463508,72
7	2060	433353	442630,104	86064658,63
9	4120	883940	887304,588	11320452,41
10	5150	1115353	1109641,83	32617462,77
				197.235.457

LOD =	69,0071 ng/ml
LOQ =	230,0237 ng/ml

Kondisi analisis: kolom penukar kation kuat (Supelcosil® LC-SCX, 5 μm, 250 x 4,6 mm); suhu kolom 30°C; fase gerak amonium fosfat 40 mM; pH 3,00; kecepatan alir 1,5 ml/menit; detektor fluoresensi pada panjang gelombang eksitasi 286 nm dan emisi 366 nm; volume penyuntikan 20 μl

Tabel 4.12 Hasil pengukuran batas deteksi dan batas kuantitasi O⁶-metilguanin secara statistika

No.	Konsentrasi (ng/ml) (x)	Area ($\mu\text{V/s}$)	Area terukur ($\mu\text{V/s}$) (yi)	Selisih ($\mu\text{V/s}$) ($y-y_i$) ²
1	1,002	7750	5214,86151	6426927,163
2	2,004	13479	13103,86302	140727,7538
3	5,01	36192	36770,86755	335087,6404
4	20,04	172401	155105,8902	299120823
5	50,1	408029	391775,9355	264162105,6
6	100,2	772764	786226,011	181225740,2
7	200,4	1549729	1575126,162	645015837,7
9	400,8	3175269	3152926,464	499188914,9
10	501	3942501	3941826,615	454795,1282
				1.889.644.032

LOD =	6,7621 ng/ml
LOQ =	22,5403 ng/ml

Kondisi analisis: kolom penukar kation kuat (Supelcosil @ LC-SCX, 5 μm , 250 x 4,6 mm); suhu kolom 30°C; fase gerak amonium fosfat 40 mM; pH 3,00; kecepatan alir 1,5 ml/menit; detektor fluoresensi pada panjang gelombang eksitasi 286 nm dan emisi 366 nm; volume penyuntikan 20 μl

Tabel 4.13 Hasil pengukuran ketepatan (akurasi) dan keseksamaan (presisi) N⁷-metilguanin

Konsentrasi Sebenarnya (ppm)	Area (μV/s) (y)	Konsentrasi terukur (ppm)	Konsentrasi rata-rata (ppm)	Area rata-rata (μV/s) (ȳ)	Selisih (μV/s) (y-ȳ) ²	Σ (y-ȳ) ²	SD	KV (%)	%diff
2,678	744794	2,721	2,70	739175,50	31567542,25	139726749,50	5286,34	0,72	1,60
	743567	2,716			19285272,25				1,43
	742460	2,712			10787940,25				1,28
	736547	2,690			6909012,25				0,46
	736516	2,690			7072940,25				0,46
	731169	2,670			64104042,25				-0,28
3,399	927855	3,400	3,423	934051,67	38398677,778	140063437,333	5292,701	0,57	0,03
	928205	3,401			34183511,111				0,06
	932364	3,417			2848218,778				0,52
	938028	3,438			15811226,778				1,14
	939718	3,444			32107333,444				1,32
	938140	3,438			16714469,444				1,15
4,120	1139599	4,185	4,185	1139412,67	34720,111	115180227,333	4799,588	0,42	1,58
	1143822	4,201			19442220,444				1,96
	1143348	4,199			15486848,444				1,92
	1137346	4,177			4271111,111				1,38
	1130934	4,153			71887788,444				0,80
	1141427	4,192			4057538,778				1,75

Kondisi analisis: kolom penukar kation kuat (Supelcosil ® LC-SCX, 5 μm, 250 x 4,6 mm); suhu kolom 30°C; fase gerak amonium fosfat 40 mM; pH 3,00; kecepatan alir 1,5 ml/menit; detektor fluoresensi pada panjang gelombang eksitasi 286 nm dan emisi 366 nm; volume penyuntikan 20 μl

Tabel 4.14 Hasil pengukuran ketepatan (akurasi) dan keseksamaan (presisi) O⁶-metilguanin

Konsentrasi Sebenarnya (ppm)	Area (μV/s)	Konsentrasi terukur (ppm)	Konsentrasi rata-rata (ppm)	Luas puncak rata-rata (μV/s) (\bar{y})	Selisih (μV/s) (y- \bar{y}) ²	$\Sigma (y-\bar{y})^2$	SD	KV (%)	%diff
0,186	1606473	0,186	0,18	1592320,83	200283821,36	517743006,83	10175,88	0,64	-0,06
	1596483	0,185			17323631,36				-0,74
	1583162	0,183			83884228,03				-1,64
	1594782	0,185			6057341,36				-0,85
	1594960	0,185			6965200,69				-0,84
	1578065	0,182			203228784,03				-1,98
0,300	2507747	0,299	0,298	2494355,83	179323344,694	3247796860,83	25486,45	1,02	-0,17
	2503477	0,299			83195681,361				-0,35
	2472339	0,295			484740950,028				-1,65
	2464609	0,294			884874093,361				-1,98
	2484611	0,296			94961776,694				-1,14
	2533352	0,303			1520701014,694				0,91
0,414	3471278	0,421	0,415	3423408,50	2291489030,250	6919329473,50	37200,35	1,09	1,70
	3454622	0,419			974282582,250				1,20
	3411795	0,413			134873382,250				-0,10
	3391423	0,411			1023072210,250				-0,72
	3375121	0,409			2331682656,250				-1,22
	3436212	0,416			163929612,250				0,64

Kondisi analisis: kolom penukar kation kuat (Supelcosil ® LC-SCX, 5 μm, 250 x 4,6 mm); suhu kolom 30°C; fase gerak amonium fosfat 40 mM; pH 3,00; kecepatan alir 1,5 ml/menit; detektor fluoresensi pada panjang gelombang eksitasi 286 nm dan emisi 366 nm; volume penyuntikan 20 μl

Tabel 4.15 Uji Stabilitas N⁷-metilguanin

Area ($\mu\text{V/s}$)		
Hari ke-1	Hari ke-2	Hari ke-3
261461	252332	251951
262435	254030	250697
258647	252690	245242
$\bar{x} = 260847,667$	$\bar{x} = 260847,667$	$\bar{x} = 253017,333$
$\bar{x} =$	258237,5556	
SD =	4501,382932	
KV =	1,74	

Kondisi analisis: kolom penukar kation kuat (Supelcosil ® LC-SCX, 5 μm , 250 x 4,6 mm); suhu kolom 30°C; fase gerak amonium fosfat 40 mM; pH 3,00; kecepatan alir 1,5 ml/menit; detektor fluoresensi pada panjang gelombang eksitasi 286 nm dan emisi 366 nm; volume penyuntikan 20 μl

Tabel 4.16 Uji Stabilitas O⁶-metilguanin

Area ($\mu\text{V/s}$)		
Hari ke-1	Hari ke-2	Hari ke-3
740764	711503	707211
738280	711978	706734
727996	709683	706342
$\bar{x} = 735680$	$\bar{x} = 711054,667$	$\bar{x} = 706762,333$
$\bar{x} =$	717832,3333	
SD =	13946,44814	
KV =	1,94	

Kondisi analisis: kolom penukar kation kuat (Supelcosil ® LC-SCX, 5 μm , 250 x 4,6 mm); suhu kolom 30°C; fase gerak amonium fosfat 40 mM; pH 3,00; kecepatan alir 1,5 ml/menit; detektor fluoresensi pada panjang gelombang eksitasi 286 nm dan emisi 366 nm; volume penyuntikan 20 μl

Tabel 4.17 Data zat yang terdeteksi dari sampel darah tikus hasil orientasi

Hewan Coba		Zat yang Terdeteksi	Area ($\mu\text{V/s}$)	Konsentrasi ($\mu\text{g/ml}$)
Kelompok	Tikus ke-			
I (0,25 x 220 mg/kg bb NaNO ₂)	1	Guanin	1192599	6,039
		Adenin	366850	8,819
	2	Guanin	2263690	11,977
		Adenin	50660	0,593
	3	Guanin	36867	0,367
		Adenin	29753	0,049
II (0,5 x 220 mg/kg bb NaNO ₂)	1	Guanin	40762	0,346
		Adenin	28299	0,011
	2	Guanin		Tikus mati
		Adenin		
	3	Guanin	70046	0,183
		Adenin	24465	0,089
III (1 x 220 mg/kg bb NaNO ₂)	1	Guanin		
		Adenin		
	2	Guanin		Tikus mati
		Adenin		
	3	Guanin		
		Adenin		
IV (0,25 x 220 mg/kg bb NaNO ₂ dan dimetilamin)	1	Guanin		Tikus mati
		Adenin		
	2	Guanin	2913994	15,582
		Adenin	117774	2,339
	3	Guanin	66169	0,205
		Adenin	32827	0,129
V (0,5 x 220 mg/kg bb NaNO ₂ dan dimetilamin)	1	Guanin	70297	0,182
		Adenin	52799	0,648
	2	Guanin	460545	1,981
		Adenin	169860	3,694
	3	Guanin	6354509	34,654
		Adenin	151528	3,217
VI (1 x 220 mg/kg bb NaNO ₂ dan dimetilamin)	1	Guanin		
		Adenin		
	2	Guanin		Tikus mati
		Adenin		
	3	Guanin		
		Adenin		

Tabel 4.18 Data zat yang terdeteksi dari sampel darah tikus hasil uji

Hewan Coba Kelompok	Tikus ke-	Zat yang Terdeteksi	Area (μ V/s)	Konsentrasi (μ g/ml)
I Nitrosodimetilamin dengan pengambilan darah pada waktu 1 jam setelah induksi	1	Guanin	253257	9,08
		Adenin	19353	0,22
	2	Guanin	3343382	119,90
		Adenin	834667	20,99
	3	Guanin	1676777	60,13
		Adenin	499737	12,28
	4	Guanin	4167631	149,46
		Adenin	1154409	29,31
II Nitrosodimetilamin dengan pengambilan darah pada waktu 2 jam setelah induksi	1	Guanin	12032100	431,49
		Adenin	3635712	93,86
	2	Guanin	1187894	42,60
		Adenin	38018	0,26
	3	Guanin	8173532	293,12
		Adenin	2384118	61,30
	4	Guanin	6374944	228,62
		Adenin	1761332	45,10
III Natrium nitrit dan dimetilamin dengan pengambilan darah pada waktu 1 jam setelah induksi	1	Guanin	624127	22,38
		Adenin	76043	1,25
	2	Guanin	7709662	276,48
		Adenin	2515053	64,71
	3	Guanin	70342	2,52
		Adenin	19383	0,22
	4	Guanin	4049009	145,20
		Adenin	1308565	33,32
IV Natrium nitrit dan dimetilamin dengan pengambilan darah pada waktu 2 jam setelah induksi	1	Guanin	776096	27,83
		Adenin	30528	0,07
	2	Guanin	288906	10,36
		Adenin	18105	0,25
	3	Guanin	DNA gagal diisolasi	
		Adenin	DNA gagal diisolasi	
	4	Guanin	7050205	252,83
		Adenin	2039155	52,33
V Natrium nitrit dan dimetilamin dengan pengambilan darah pada waktu 4 jam setelah induksi	1	Guanin	905259	32,46
		Adenin	14385	0,35
	2	Guanin	1360618	48,79
		Adenin	24767	0,08
	3	Guanin	823543	29,53
		Adenin	231782	5,30
	4	Guanin	3838043	137,64
		Adenin	1022741	25,88

Tabel 4.18 (Sambungan)

VI Air (kontrol negatif)	1	Guanin	8060852	289,08
		Adenin	2269792	58,33
	2	Guanin	571748	20,50
		Adenin	30114	0,06
	3	Guanin	10630887	381,24
		Adenin	2907052	74,91
	4	Guanin	4063786	145,73
		Adenin	1068278	27,07





Lampiran 3.1
Sertifikat analisis guanin



SIGMA-ALDRICH

Certificate of Analysis

Product Name	Guanine
Product Number	G6779
Product Brand	SIGMA
CAS Number	73-40-5
Molecular Formula	C ₅ H ₅ N ₅ O
Molecular Weight	151.13

TEST	SPECIFICATION	LOT 033K5008 RESULTS
APPEARANCE	WHITE TO OFF-WHITE POWDER	OFF-WHITE POWDER
SOLUBILITY	COMPLETE COLORLESS (0.1 M IN 1 N SODIUM HYDROXIDE AT 20 DEG CENTIGRADE)	CONFORMS
PURITY BY HPLC	MINIMUM 99%	100.0%
RESIDUE ON IGNITION	<0.1%	PASS
INSOLUBLE MATTER	<0.1%	PASS
ALUMINUM (AL)	<0.002%	PASS
CALCIUM (CA)	<0.005%	PASS
COPPER (CU)	<0.0005%	PASS
IRON (FE)	<0.002%	PASS
LEAD (PB)	<0.001%	PASS
MAGNESIUM (MG)	<0.0005%	PASS
PHOSPHORUS (P)	<0.005%	PASS
POTASSIUM (K)	<0.005%	PASS
SODIUM (NA)	<0.05%	PASS
ZINC (ZN)	<0.002%	PASS

Lori Schultz

Lori Schultz, Manager
Analytical Services

Lampiran 3.2
Sertifikat analisis adenin

Certificate of Analysis

SIGMA-ALDRICH

Product Name Adenine,
≥99%
Product Number A8626
Product Brand SIGMA
CAS Number 73-24-5
Molecular Formula C₅H₅N₅
Molecular Weight 135.13

TEST

APPEARANCE

SOLUBILITY

IR SPECTRUM

ELEMENTAL ANALYSIS

ULTRAVIOLET/VISIBLE SPECTRUM

PURITY BY THIN LAYER

CHROMATOGRAPHY

PURITY BY HPLC

SPECIFICATION

WHITE TO OFF-WHITE POWDER
CLEAR TO SLIGHTLY HAZY
COLORLESS TO FAINT YELLOW
SOLUTION AT 80MG PLUS 4ML OF
0.5M HYDROCHLORIC ACID

99% MINIMUM

LOT 043H0583 RESULTS

WHITE POWDER

CLEAR COLORLESS SOLUTI
400 MG PLUS 4.0 ML OF 1 M
HYDROCHLORIC ACID

CONSISTENT WITH STRUCT
44.22% CARBON 51.81% NITI
EMM = 12.9 AT LAMBDA MAX
AT PH 1.0


>99% (SINGLE SPOT)

>99.9% (SINGLE PEAK)

Rodney Burbach

Rodney Burbach, Manager
Quality Control
St. Louis, Missouri USA

Lampiran 3.3
Sertifikat analisis N⁷-metilguanin



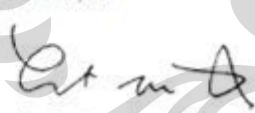
SIGMA-ALDRICH

Certificate of Analysis

Product Name	7-Methylguanine, purum, ≥96.0% (HPLC)
Product Number	67073
Product Brand	Fluka
CAS Number	578-76-7
Molecular Formula	C ₅ H ₇ N ₅ O
Molecular Weight	155.15

TEST	LOT 1316539 RESULTS
APPEARANCE (COLOR)	FAINTLY YELLOW
APPEARANCE (FORM)	FIBRES
PURITY (HPLC AREA %)	100.0 % rel
CARBON CONTENT	43.38 %
HYDROGEN CONTENT	4.14 %
NITROGEN CONTENT	42.29 %

Sigma-Aldrich guarantees the 'Sales-Specification' values only, non-specified tests may be included as additional information. The current 'Sales-Specifications' sheet is available on request. For further inquiries, please contact our Technical Service. Sigma-Aldrich warrants, that its products conform to the information contained in this and other Sigma-Aldrich publications. Purchaser must determine the suitability of the product for its particular use. See reverse side of invoice for additional terms and conditions of sale. The values given on the 'Certificate of Analysis' are the results determined at the time of analysis.



Dr. Gert van Look, Manager
Quality Control
Buchs Switzerland

Lampiran 3.4
Sertifikat analisis O⁶-metilguanin



SIGMA-ALDRICH

Certificate of Analysis

Product Name	6-O-Methylguanine, 97%
Product Number	363057
Product Brand	Aldrich
CAS Number	20535-63-5
Molecular Formula	C ₈ H ₇ N ₅ O
Molecular Weight	165.15

TEST	SPECIFICATION	LOT 11803CS RESULTS
APPEARANCE	WHITE TO OFF-WHITE POWDER OR CRYSTALLINE	WHITE POWDER
INFRARED SPECTRUM	CONFORMS TO STRUCTURE.	CONFORMS TO STRUCTURE.
ELEMENTAL ANALYSIS	CARBON 42.1% - 45.2% NITROGEN 40.9% - 43.9%	CARBON 42.69% HYDROGEN 4.23% NITROGEN 41.22%
HIGH PRESSURE LIQUID CHROMATOGRAPHY	96.5% (MINIMUM)	96.5 %



Ronnie J. Martin, Supervisor
Quality Control
Milwaukee, Wisconsin USA

Lampiran 3.5
Sertifikat analisis nitrosodimetilamin

2009年 5月14日 10:22 大倉社-子/子/子 FAX番号:3662-6910 P.007
CERTIFICATE OF ANALYSIS : 147-03781 1/1 ページ

Wako Wako Pure Chemical Industries, Ltd.
1-2, Doshomachi 3-Chome, Chuo-Ku, Osaka 540-8605, Japan

Certificate of Analysis

Product Number : 147-03781		
Chemical Name : N-Nitrosodimethylamine Standard		
Grade : for Gas Chromatography		
Lot Number : KW09990		
Unit : 1g		


TEST	SPECIFICATION	RESULT
Appearance	Pale yellow-yellow, clear liquid	Passed
Solubility in Water	to pass test	Clear
Water	max. 0.5%	0.36%
Assay (GC)	min. 99.5%	100.0%
Date of QC-Release		Feb. 23, 2009
Expiration date 2-year		2011.02

M. Naraura
Mitsuo Naraura General Manager
Q.A. Department

This is an electronically generated document.

Date of Issue : May 12, 2009
Issuing Number : 7492921

Lampiran 3.6
Sertifikat analisis natrium nitrit

 MERCK

Specification

<http://certificates.merck.de>

Date of print: 06.06.2010

1.06549.0500 Sodium nitrite for analysis EMSURE®
ACS, Reag. Ph Eur

	Spec. Values	
Assay (manganometric)	≥ 99.0	%
Insoluble matter	≤ 0.01	%
Chloride (Cl)	≤ 0.005	%
Sulphate (SO ₄)	≤ 0.005	%
Heavy metals (as Pb)	≤ 0.001	%
Ca (Calcium)	≤ 0.002	%
Fe (Iron)	≤ 0.001	%
K (Potassium)	≤ 0.001	%

Dr. Matthias Ohm

responsible laboratory manager quality control

This document has been produced electronically and is valid without a signature

Merck KGaA, Frankfurter Straße 250, 64293 Darmstadt (Germany): +49 6151 72-0 Page 1 of 1
SA-7 Anfo: 20367124 1065490000000000 V. 982

Lampiran 3.7
Sertifikat analisis dimetilamin

Specification



<http://certificates.merck.de>

Date of print: 15.01.2010

8.22033.1000 Dimethylamine (40% aqueous solution) for synthesis

	Spec. Values
Assay (acidimetric)	~40%
Density (d 20 °C/ 4 °C)	0.890 - 0.900

Dr. Wolfgang Bolkart
responsible laboratory manager quality control

This document has been produced electronically and is valid without a signature

Lampiran 4.1
Cara perhitungan resolusi (R)

$$R = \frac{2(t_{RA} - t_{RB})}{W_A - W_B}$$

Dimana:

R = Resolusi

t_{RB} = Waktu retensi spesi B

t_{RA} = Waktu retensi spesi A

W_B = Lebar puncak spesi B, yang diperoleh dengan ekstrapolasi tepi puncak yang relatif lurus sampai garis dasar

W_A = Lebar puncak spesi A, yang diperoleh dengan ekstrapolasi tepi puncak yang relatif lurus sampai garis dasar

Lampiran 4.2

Cara perhitungan jumlah lempeng teoritis (N) dan HETP

$$N = 16 \left(\frac{t_R}{W} \right)^2$$

$$\text{HETP} = \frac{L}{N}$$

Dimana:

N = Jumlah pelat teoritis

HETP = Panjang lempeng teoritik

 t_R = Waktu retensi

W = Lebar puncak yang diperoleh dengan ekstrapolasi tepi puncak yang relatif lurus sampai garis dasar

L = Panjang kolom

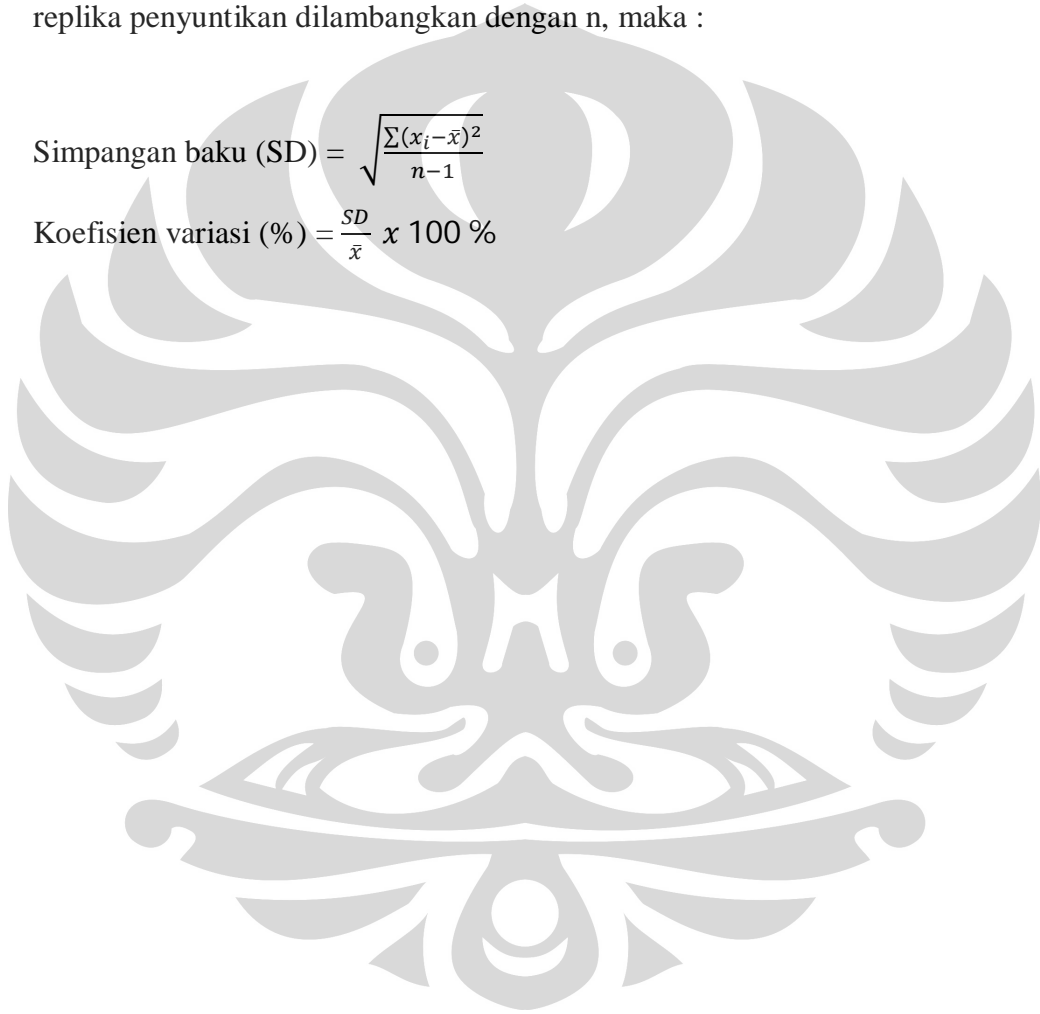
Lampiran 4.3

Cara perhitungan simpangan baku dan koefisien variasi

Jika hasil pengukuran luas puncak rata-rata dilambangkan dengan \bar{x} , dan jumlah replika penyuntikan dilambangkan dengan n, maka :

$$\text{Simpangan baku (SD)} = \sqrt{\frac{\sum(x_i - \bar{x})^2}{n-1}}$$

$$\text{Koefisien variasi (\%)} = \frac{SD}{\bar{x}} \times 100 \%$$



Lampiran 4.4

Cara perhitungan persamaan garis linear (linearitas)

Persamaan garis : $y = a + bx$

a (intercept) dan b (slope) dapat dihitung dengan rumus :

$$a = \frac{(\sum y) (\sum x^2) - (\sum x) (\sum xy)}{n (\sum x^2) - (\sum x)^2}$$

$$b = \frac{n (\sum xy) - (\sum x) (\sum y)}{n (\sum x^2) - (\sum x)^2}$$

r (koefisien korelasi) dapat dihitung dengan rumus :

$$r = \frac{n (\sum xy) - (\sum x) (\sum y)}{\sqrt{[n (\sum x^2) - (\sum x)^2][n (\sum y^2) - (\sum y)^2]}}$$

Linearitas suatu metode ditentukan dari harga koefisien fungsi regresi (V_{x_0}) yang dapat diperoleh dari rumus :

$$\text{Simpangan baku residual} = S_y = \sqrt{\frac{\sum (y_i - \hat{y})^2}{n-2}}$$

$$\text{Koefisien fungsi regresi} = V_{x_0} = \frac{S_y}{bx} \times 100\%$$

Lampiran 4.5

Cara perhitungan batas deteksi dan batas kuantitasi

$$\text{Batas deteksi (LOD)} = \frac{3 \cdot S_y}{b}$$

$$\text{Batas kuantitasi (LOQ)} = \frac{10 \cdot S_y}{b}$$



Lampiran 4.6
Cara perhitungan ketepatan (akurasi)

Misal, diketahui konsentrasi N⁷-metilguanin yang disuntikkan ke dalam KCKT adalah 2,678 µg/ml, dan dari hasil pengukuran diperoleh luas puncak 744.794, maka dengan menggunakan persamaan regresi dapat diperoleh:

$$y = 215,8614x - 2044,38$$

$$744.794 = 215,8614x - 2044,38$$

$$x = 2,721 \text{ µg/ml}$$

$$\% \text{ differensiasi (\% diff)} = \frac{(2,721 - 2,678)}{2,678} \times 100 \%$$

$$= 0,60 \%$$

Lampiran 4.7

Perhitungan nitrosodimetilamin untuk reaksi *in vitro*

LD₅₀ Nitrosodimetilamin pada tikus adalah : 40 mg/kg

Untuk 1 ekor tikus dengan berat badan 200 mg dibutuhkan Nitrosodimetilamin sebanyak : 40 mg/kg*0,2 kg = 8,0 mg

Diketahui massa jenis nitrosodimetilamin adalah 1,066 g/ml

Jika yang diinginkan 8,0 mg, maka volume yang digunakan = $\frac{massa}{\rho} = \frac{8 \cdot 10^{-3}}{1,066} = 7,50 \cdot 10^{-3} \text{ ml} = 7,51 \mu\text{l}$ →terlalu kecil, sebaiknya nitrosodimetilamin diencerkan terlebih dahulu.

Pembuatan larutan nitrosodimetilamin dengan konsentrasi 10,66 mg/ml dilakukan dengan cara pipet 0,05 ml nitrosodimetilamin dengan konsentrasi 1,066 g/ml, larutkan dengan dapar Tris-HCl 0,01 M pH 7,5 dalam labu ukur 5 ml hingga batas.

$$\frac{0,05}{5} \times 1,066 \frac{\text{g}}{\text{ml}} = 10,66 \frac{\text{mg}}{\text{ml}}$$

Untuk mengambil nitrosodimetilamin sebanyak 8,0 mg, maka larutan yang diambil adalah :

$$\frac{8,0}{10,66} = 0,751 \text{ ml}$$

Lampiran 4.8

Perhitungan dosis NaNO₂ dan dimetilamin untuk tikus

LD₅₀ NaNO₂ = 220 mg/kg bb

Konsentrasi NaNO₂ yang dibuat = 22 mg/ml

Dosis NaNO₂ untuk tikus dengan berat badan 200 g = $\frac{200}{1000} \times 220 = 44$ mg

Sehingga untuk tikus dengan berat 200 g diberikan NaNO₂ sebanyak 2 ml

Dimetilamin yang diberikan $\frac{1}{5}$ x dosis NaNO₂

Konsentrasi dimetilamin yang dibuat = 4,4 mg/ml

Dosis dimetilamin untuk tikus dengan berat badan 200 g = $\frac{1}{5} \times \frac{200}{1000} \times 220 = 8,8$ mg

Sehingga untuk tikus dengan berat badan 200 g diberikan dimetilamin sebanyak 2 ml

Keterangan :

Natrium nitrit	Dimetilamin
1xLD ₅₀ = 220 mg/kg bb	44 mg/kg bb
0,5xLD ₅₀ = 110 mg/kg bb	22 mg/kg bb
0,25xLD ₅₀ = 55 mg/kg bb	11 mg/kg bb