

**STUDI DETEKSI *DNA-ADDUCT* 8-HIDROKSI-2'-DEOKSIGUANOSIN  
SEBAGAI *BIOMARKER* RISIKO KANKER PADA PETUGAS BEBERAPA  
SPBU DI DKI JAKARTA**

**RATIH ARIYANI**

**030403043X**



**UNIVERSITAS INDONESIA  
FAKULTAS MATEMATIKA DAN ILMU PENGETAHUAN ALAM  
DEPARTEMEN KIMIA  
DEPOK  
2009**

**STUDI DETEKSI *DNA-ADDUCT* 8-HIDROKSI-2'-DEOKSIGUANOSIN  
SEBAGAI *BIOMARKER* RISIKO KANKER PADA PETUGAS BEBERAPA  
SPBU DI DKI JAKARTA**

**Skripsi diajukan sebagai salah satu syarat  
untuk memperoleh gelar Sarjana Sains**

**Oleh:**

**RATIH ARIYANI**

**030403043X**



**DEPOK**

**2009**

SKRIPSI : **STUDI DETEKSI *DNA-ADDUCT* 8-HIDROKSI-2'-  
DEOKSIGUANOSIN SEBAGAI *BIOMARKER* RISIKO  
KANKER PADA PETUGAS BEBERAPA SPBU DI DKI  
JAKARTA**

NAMA : RATIH ARIYANI

NPM : 030403043X

SKRIPSI INI TELAH DIPERIKSA DAN DISETUJUI

DEPOK, JULI 2009

Dr. rer.nat. Budiawan

Dra.Sri Handayani, M.Biomed.

PEMBIMBING I

PEMBIMBING II

Tanggal lulus Ujian Sidang Sarjana : Juli 2009

Penguji I : Drs. Sultan Badjri, M.Si .....

Penguji II : Drs. Sunardi, M.Si .....

Penguji III : Prof. Sumi Hudyono, PWS. ....

## KATA PENGANTAR

Puji syukur penulis persembahkan kepada Tuhan karena atas rahmat, kasih sayang dan petunjuk-Nya penulis dapat menyelesaikan penelitian dan penulisan skripsi ini tepat pada waktunya.

Terima kasih penulis ucapkan kepada Papa dan Mama, Retno dan Renny, serta *my doggies*, yang menghibur penulis saat penulis mengalami kesedihan. Tidak lupa juga penulis ucapkan terima kasih kepada seluruh keluarga penulis yang telah memberi dukungan semangat.

Rasa terimakasih yang begitu dalam juga penulis ucapkan kepada orang-orang yang telah membantu penulis:

1. Dr.rer.nat Budiawan selaku pembimbing I atas bantuannya selama penelitian dan penyusunan skripsi yang sangat berarti bagi penulis.
2. Dra.Sri Handayani, M.Biomed selaku pembimbing II yang telah banyak membantu penulis selama penelitian.
3. Dr. Ridla Bakri selaku ketua Departemen Kimia FMIPA UI
4. Dra. Tresye Utari, M.Si. selaku koordinator penelitian yang telah memberikan kesempatan dan bantuan dalam penelitian.
5. Seluruh dosen-dosen yang selama ini telah mengajarkan ilmu-ilmu yang sangat bermanfaat bagi penulis.
6. Mbak Neera yang telah banyak membantu saya selama penelitian dan telah banyak memberi dorongan semangat.
7. Pak Sunardi, selaku dosen pembimbing akademis penulis.

8. Pak Hedi S., Mbak Ina, Mbak Cucu, Pak Amin, Pak Kiri, Babe serta seluruh staf departemen Kimia.
  9. Prof. Hiroshi Kasai, Yuki Matsumoto, Tetsuya Mizoue serta Dr. Marcus S. Cooke atas diskusi kecil melalui *e-mail* mengenai penelitian-penelitian beliau yang penulis jadikan acuan.
  10. Sahabat-sahabatku: Ana, Habibah, Iman, Opik, Fery, Wuri, Daniel, Fajriah, Ria, Cicil, Jessie, Adin, Muris, Alex dan Destya serta rekan penelitian di lantai 3 maupun lantai 4.
  11. Teman seangkatan kimia 2004, terima kasih telah sangat membantu dan memberi semangat pada penulis.
  12. Adik-adik kimia 2005, 2006, dan 2007.
  13. Kepala Stasiun Pengisian Bahan Bakar Umum di wilayah DKI Jakarta yang telah mengizinkan pengambilan sampel.
  14. Responden-responden yang bersedia diambil sampelnya.
  15. Pihak-pihak lain yang membantu kelancaran penulisan skripsi.
- Akhir kata semoga skripsi ini dapat bermanfaat bagi semua pihak.

Amin.

Penulis

2009

## ABSTRAK

Paparan zat toksik di lingkungan dapat berkontribusi pada terbentuknya radikal bebas dalam tubuh. Paparan zat toksik ini dapat berasal dari uap bensin, asap rokok, sinar UV dan radiasi. Dalam lingkungan Stasiun Pengisian Bahan Bakar Umum, banyak terdapat paparan uap bensin yang banyak mengandung zat-zat karsinogenik yang dapat menghasilkan spesies oksigen reaktif setelah mengalami metabolisme dalam tubuh. Spesies oksigen reaktif ini dapat menyebabkan kerusakan DNA, yang mengacu pada terealisasinya risiko kanker. Salah satu *biomarker* kerusakan DNA yang umum dipelajari adalah 8-hidroksi-7,8-dihidro-2'-deoksiganosin (8-OHdG). 8-OHdG ini dapat terekskresikan melalui urin dan dapat digunakan sebagai *biomarker* kerusakan DNA.

Pada penelitian ini dilakukan studi deteksi 8-hidroksi-7,8-dihidro-2'-deoksiganosin sebagai *biomarker* oksidatif stress akibat spesies oksigen reaktif. Dalam studi ini dilakukan pencarian kondisi optimum pengukuran 8-hidroksi-7,8-dihidro-2'-deoksiganosin, serta validasi dan verifikasi metode dengan modifikasi yang disesuaikan dengan kondisi peralatan yang digunakan. Kondisi optimum yang diperoleh adalah dengan komposisi eluen metanol: buffer fosfat pH 6,7 = 10:90. Sampel urin diambil dari petugas SPBU dan kontrol yang tidak bekerja di SPBU dan tidak terpapar bahan-bahan toksik dari lingkungan kerja. Sampel urin ditentukan kadar kreatininnya dengan UV-Vis ( $\lambda=486$  nm) dan diukur konsentrasi 8-OHdG dengan

instrumentasi HPLC-detektor UV ( $\lambda=254$  nm). Hasil pengukuran 8-hidroksi-7,8-dihidro-2'-deoksiguanosin dibagi dengan hasil pengukuran kreatinin untuk mengetahui kadar 8-OH-dG dalam kreatinin. Limit deteksi (LOD) pengukuran 8-OHdG dengan instrumentasi HPLC adalah 5.74  $\mu\text{g/L}$ . Batas kuantitasnya (LOQ) adalah 19.12  $\mu\text{g/L}$ .

Konsentrasi 8-OHdG yang terukur pada sampel SPBU adalah 701,78-21.571,17 sedangkan pada sampel urin kontrol adalah 62,73-7.322,57  $\mu\text{g/g}$  kreatinin. Jadi dapat disimpulkan bahwa kadar 8-OHdG pada sampel petugas SPBU lebih tinggi daripada kontrol.

Kata kunci: *8-OHdG, oxidative stress, reactive oxygen species.*

xii + 58 hlm.; 27 gbr.; 18 lamp.; 2 tab.

## DAFTAR ISI

	Halaman
KATA PENGANTAR .....	i
ABSTRAK .....	iii
DAFTAR ISI .....	v
DAFTAR GAMBAR .....	ix
DAFTAR TABEL .....	xi
DAFTAR LAMPIRAN .....	xii
BAB I PENDAHULUAN .....	1
1.1 Latar Belakang Masalah.....	1
1.2 Perumusan Masalah.....	1
1.3 Tujuan Penelitian .....	2
1.4 Hipotesis .....	2
BAB II TINJAUAN PUSTAKA .....	3
2.1 DNA .....	3
2.2 Kerusakan DNA .....	4
2.2.1 Sumber Kerusakan DNA .....	6
2.2.2 Tipe Kerusakan DNA .....	9
2.3 Kreatinin .....	11
2.4 <i>Biomarker</i> Kerusakan DNA .....	13



2.5	<i>DNA-Adduct</i> 8-hidroksi-2'-deoksiguanosin sebagai <i>Biomarker</i>	
	Kerusakan DNA.....	19
BAB III METODE PENELITIAN .....		23
3.1	Lokasi Penelitian.....	23
3.2	Alat dan Bahan.....	24
3.2.1	Alat.....	24
3.2.2	Bahan.....	24
3.2.3	Sampel.....	24
3.3	Metode Kerja.....	25
3.3.1	Pengambilan Sampel.....	25
3.3.2	Verifikasi Metode.....	25
3.3.3	Analisis Sampel.....	25
3.3.3.1	Analisis Jumlah Kreatinin .....	25
3.3.3.1.1	Pembuatan Larutan Standar Kreatinin....	26
3.3.3.1.2	Analisis Kreatinin pada Sampel Urin.....	26
3.3.3.2	Analisis 8-OHdG sebagai <i>Biomarker</i> Oksidatif	
	Stress.....	26
3.3.3.2.1	Pembuatan Larutan Stok 8-OHdG.....	26
3.3.3.2.2	Kondisi Optimal Untuk HPLC.....	26
3.3.3.2.3	Kurva Kalibrasi.....	27
3.3.3.2.4	Limit Deteksi (LOD) dan Limit Kuantifikasi	
	(LOQ).....	27

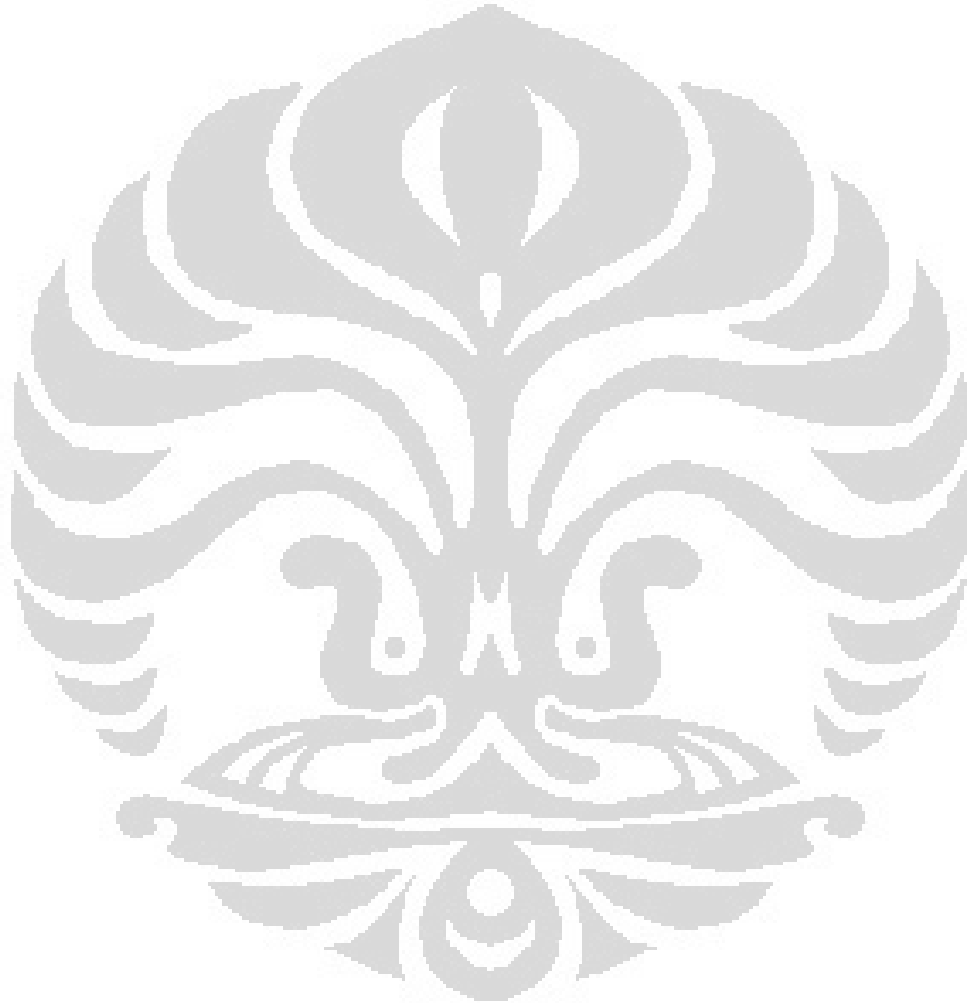
3.3.3.2.5	Presisi.....	27
3.3.3.2.6	Perolehan Kembali.....	27
3.3.3.2.7	Analisis 8-OHdG dalam Sampel Urin.....	28
3.4	Bagan Penelitian.....	29
3.4.1	Skema Umum Penelitian.....	29
3.4.2	Skema Kerja Kreatinin.....	30
3.4.2.1	Pembuatan Larutan Standar Kreatinin.....	30
3.4.2.2	Analisa Kreatinin dalam Sampel Urin.....	30
3.4.3	Skema Kerja 8-OHdG .....	31
3.4.3.1	Pembuatan Larutan Standar 8-OHdG.....	31
3.4.3.2	Analisis 8-OHdG dalam Sampel Urin.....	32
BAB IV HASIL DAN PEMBAHASAN .....		33
4.1	Deskripsi Sampel.....	33
4.1.1	Hasil Pengukuran Kreatinin.....	36
4.1.2	Verifikasi Metode Analisis 8-OHdG.....	38
4.1.2.1	Kondisi Optimum Analisis.....	38
4.1.2.2	Kurva Kalibrasi.....	40
4.1.2.3	Batas Deteksi (LOD) dan Batas Kuantifikasi (LOQ).....	41
4.1.2.4	Uji Keterulangan.....	41
4.1.3	Hasil Pengukuran 8-OHdG dalam Sampel Urin.....	42
4.2	Pembahasan.....	44

BAB V PENUTUP.....53

    5.1 Kesimpulan.....53

    5.2 Saran.....53

DAFTAR PUSTAKA.....55



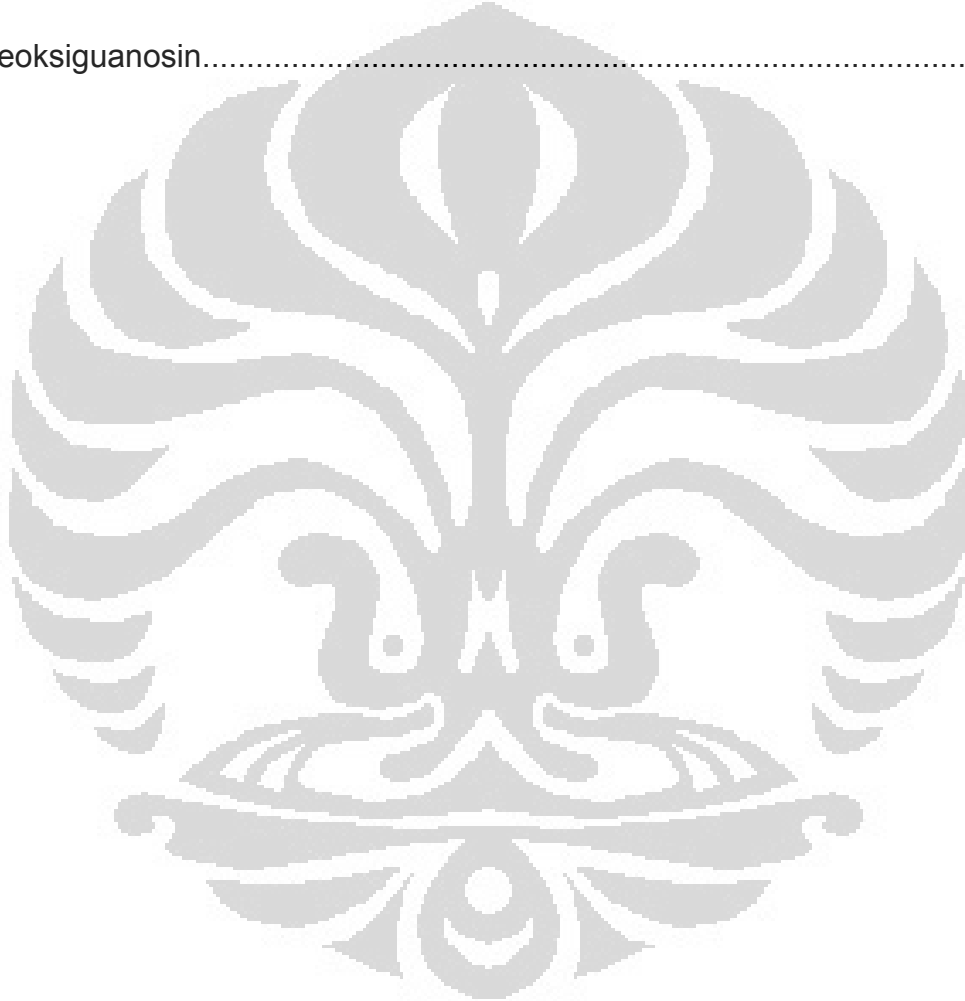
## DAFTAR GAMBAR

Gambar 2.1 Struktur DNA double heliks.....	4
Gambar 2.2 Hasil metabolisme benzena oleh CYP450 dapat mengakibatkan kerusakan DNA.....	8
Gambar 2.3 Jalur metabolisme, pembentukkan ROS dan pembentukkan <i>DNA Adduct</i> akibat paparan benzo[a]pirena.....	9
Gambar 2.4 Sintesa kreatin dan kreatinin.....	12
Gambar 2.5 Basa-basa DNA yang reaktif.....	13
Gambar 2.6 Jalur oksidasi guanin oleh radikal OH.....	14
Gambar 2.7 Mekanisme BER ( <i>Base Excision Repair</i> ).....	18
Gambar 2.8 8-okso-dG: 8-okso-7,8-dihidro-2'-deoksiguanosin.....	19
Gambar 3.1 Skema penelitian.....	29
Gambar 3.2 Skema pembuatan larutan standar kreatinin.....	30
Gambar 3.3 Skema analisa kreatinin dalam sampel urin.....	30
Gambar 3.4 Skema kerja pembuatan deret standar 8-OHdG.....	31
Gambar 3.5 Skema kerja pengukuran 8-OHdG dalam urin.....	32
Gambar 4.1 Persentase lama bekerja sampel kelompok petugas SPBU...34	
Gambar 4.2 Persentase keluhan kesehatan kelompok sampel petugas SPBU.....	35
Gambar 4.3 Reaksi kreatinin dengan asam pikrat dalam suasana basa menghasilkan kompleks Janovsky.....	36
Gambar 4.4 Diagram batang konsentrasi kreatinin pada petugas SPBU...37	

Gambar 4.5 Diagram batang konsentrasi kreatinin pada kontrol.....	37
Gambar 4.6 Kromatogram larutan standar 8-OHdG 10 mg/L pada perbandingan eluen metanol: buffer fosfat pH 6,7 = 10: 90.....	38
Gambar 4.7 Kromatogram sampel urin pada perbandingan eluen metanol: buffer fosfat pH 6,7 = 10:90.....	39
Gambar 4.8 Kromatogram sampel urin yang ditambahkan standar 8-OHdG dengan konsentrasi 10 mg/L dengan perbandingan volume sampel urin yang telah diberikan perlakuan : volume standar 8-OHdG 10 mg/L = 1:1.....	40
Gambar 4.9 Gambar kurva kalibrasi standar 8-OHdG dengan cakupan 0-800 µg/L.....	40
Gambar 4.10 Kurva kalibrasi standar 8-OHdG dengan cakupan 1-10 mg/L.....	41
Gambar 4.11 Diagram batang [8-OHdG] pada sampel dengan konsentrasi 8-OHdG µg/gram kreatinin.....	42
Gambar 4.12 Diagram batang konsentrasi 8-OHdG (µg/g kreatinin) pada kontrol.....	43
Gambar 4.13 Diagram batang lama bekerja petugas SPBU.....	48
Gambar 4.14 Diagram batang kelompok kerja dan konsentrasi 8-OHdG pada urin petugas SPBU.....	48

## DAFTAR TABEL

Tabel 1. Korelasi antara mutasi yang diamati dan kerusakan oksidatif DNA yang spesifik (Wang et al., 1998).....	15
Tabel 2. Karakteristik fisik dan kimia dari 8-hidroksi-7,8-dihidro-2'-deoksiguanosin.....	21



## DAFTAR LAMPIRAN

LAMPIRAN 1: KONDISI ANALISIS 8-OHdG.....	59
LAMPIRAN 2: DATA KONSENTRASI KREATININ DALAM SAMPEL.....	64
LAMPIRAN 3: DATA KUANTIFIKASI 8-OHdG DALAM SAMPEL.....	65
LAMPIRAN 4: PERHITUNGAN STATISTIK.....	67
LAMPIRAN 5: INFORMED CONSENT.....	69
LAMPIRAN 6: KUESIONER.....	72



# BAB I

## PENDAHULUAN

### 1.1 Latar Belakang Masalah

Dalam lingkungan Stasiun Pengisian Bahan Bakar Umum, terdapat paparan uap bensin yang banyak mengandung zat-zat karsinogenik, seperti benzena dan toluena. Setelah mengalami metabolisme dalam tubuh, bahan-bahan karsinogenik ini menghasilkan spesies oksigen reaktif yang dapat menyerang DNA, lemak dan protein. Penyerangan spesies oksigen reaktif terhadap DNA dapat menyebabkan kerusakan DNA yang mengacu pada terealisasinya risiko kanker.

Salah satu metabolit kerusakan DNA yang umum diteliti adalah 8-hidroksi-7,8-dihidro-2'-deoksiganosin (8-OHdG). 8-OHdG ini dapat terekskresikan melalui urin dan dapat digunakan sebagai *biomarker* kerusakan DNA akibat paparan zat-zat karsinogenik di lingkungan.

### 1.2 Perumusan Masalah

Penelitian ini merupakan modifikasi dari penelitian Kasai<sup>[1]</sup> dan Mizoue<sup>[2]</sup> mengenai studi deteksi 8-OHdG sebagai *biomarker* kerusakan DNA akibat paparan zat-zat karsinogenik dari lingkungan. Pada penelitian ini, akan dilakukan studi deteksi 8-OHdG pada urin petugas SPBU dan kontrol untuk mengamati adanya pengaruh bekerja di SPBU dengan kadar 8-OHdG dengan menggunakan metode yang sama seperti metode yang digunakan



oleh Kasai<sup>[1]</sup> dan Mizoue<sup>[2]</sup> yang disesuaikan dengan kondisi peralatan yang tersedia.

### 1.3 Tujuan Penelitian

Penelitian ini dilakukan untuk mendeteksi 8-OHdG sebagai *biomarker* spesifik kerusakan oksidatif DNA yang dapat ditemukan pada urin petugas beberapa SPBU (Stasiun Pengisian Bahan Bakar Umum) di wilayah DKI Jakarta sebagai pemicu risiko kanker akibat paparan zat-zat karsinogenik yang bersumber dari lingkungan SPBU.

### 1.4 Hipotesis

- Paparan zat karsinogenik yang terdapat di lingkungan kerja petugas SPBU akan meningkatkan kadar 8-OHdG pada urin pekerja SPBU sehingga kadar 8-OHdG pada petugas SPBU lebih tinggi daripada kontrol (urin orang yang tidak bekerja di SPBU).

## BAB II

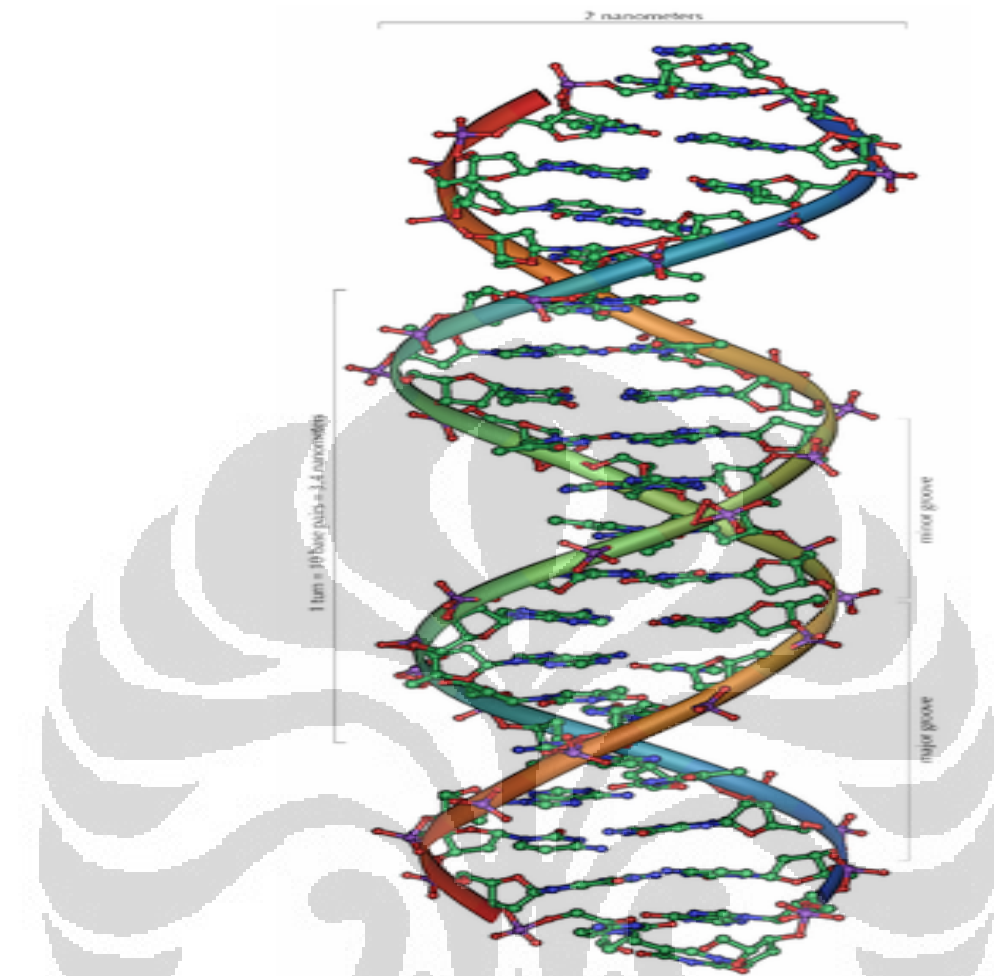
### TINJAUAN PUSTAKA

#### 2.1 DNA

DNA (*deoxyribonucleic acid*) adalah asam nukleat yang mengandung perintah genetik yang digunakan dalam perkembangan dan fungsionalisasi semua makhluk hidup dan beberapa virus. DNA dapat ditemukan di inti (nDNA) dan mitokondria (mtDNA). Peran utama molekul DNA ini adalah sebagai penyimpanan informasi. <sup>[3]</sup>

Secara kimia, DNA terdiri dari dua polimer panjang dari unit kecil yang disebut nukleotida yang terdiri dari gugus gula dan fosfat yang bergabung dengan adanya ikatan ester. Pada gula, terikat satu dari empat basa yang mengkode informasi. Informasi ini dibaca menggunakan kode genetik yang spesifik membuat asam amino dalam protein. Kode ini dibaca dengan mengkopi untai DNA ke asam nukleat RNA pada proses yang disebut transkripsi. <sup>[3]</sup>

Dalam sel, DNA dibentuk menjadi struktur yang disebut kromosom. Kromosom ini digandakan sebelum sel membelah dalam proses yang disebut replikasi DNA. Organisme eukariot menyimpan DNA di dalam inti sel sedangkan pada prokariot, DNA ditemukan pada sitoplasma sel. <sup>[3]</sup>



**Gambar 2.1.** Struktur DNA double heliks<sup>[4]</sup>

## 2.2 Kerusakan DNA

DNA dapat mengalami kerusakan karena adanya mutagen yang dapat mengubah DNA sekuens. Yang termasuk mutagen adalah agen pengoksidasi, agen pengalkilasi, dan radiasi elektromagnetik berenergi tinggi seperti sinar UV dan sinar X. Tipe kerusakan DNA bergantung pada tipe mutagen. <sup>[5]</sup>

Pada sel manusia, sekitar 10.000 basa mengalami kerusakan oksidatif setiap harinya. Dari tipe kerusakan akibat oksidasi ini, yang paling berbahaya adalah putusnya rantai ganda karena sangat sulit untuk diperbaiki dan dapat menghasilkan mutasi titik, insersi, dan delesi dari DNA sekuens seperti translokasi kromosomal.<sup>[5,6,7]</sup>

Benzena, toluena dan PAH (*polycyclic aromatic hidrocarbon*) dapat memberi kontribusi pada produksi ROS dalam tubuh akibat paparan dari lingkungan kerja. Senyawa-senyawa ini mengalami metabolisme di dalam sitokrom P450 sehingga menghasilkan produk samping berupa ROS seperti radikal hidroksil dan anion superoksida. ROS ini kemudian menyerang DNA sehingga terjadi kerusakan oksidatif DNA yang berakibat pada terjadinya mutasi.<sup>[8,9]</sup>

Banyak mutagen dapat menempati suatu tempat kosong antara dua pasangan basa, yang disebut interkalasi. Kebanyakan interkalator merupakan molekul aromatik dan planar, termasuk di antaranya etidium bromida, *daunomycin*, dan *doxorubicin*. Jika interkalator menyisip di antara pasangan basa, ikatan antar basa ini harus putus. Hal ini akan menghambat transkripsi dan replikasi DNA, serta menyebabkan toksisitas dan mutasi. Sebagai akibatnya, interkalator DNA seringkali bersifat karsinogen, contohnya benzopirena diol epoksida (BPDE), akridin, aflatoksin, dan etidium bromida.<sup>[4]</sup>

### 2.2.1 Sumber Kerusakan DNA

Kerusakan DNA dapat dibagi menjadi dua jenis berdasarkan sumbernya:

a. Kerusakan endogenus

Kerusakan endogenus disebabkan oleh serangan oleh spesies oksigen reaktif yang dihasilkan dari hasil sampingan metabolik normal. Sumber endogen ROS termasuk mitokondria, xantin oksidase, metabolisme sitokrom P450, peroksisom dan aktivasi sel inflamatori (makrofage, neutrofil, dan eosinofil).<sup>[6,7]</sup>

Pada oksidasi DNA, nukleotida guanin adalah nukleotida yang rawan terhadap oksidasi ROS. Hasil oksidasi guanin adalah 8-hidroksi-2'-deoksiguanosin (8-OH-dG). Dengan teroksidasinya guanin pada untai DNA, maka untai DNA akan kehilangan nukleotida guanin. Jumlah guanin yang hilang tergantung kadar ROS, hal ini menyebabkan keadaan yang disebut mutasi DNA yang selanjutnya dapat menyebabkan kerusakan mtDNA dan nDNA. Kerusakan pada nDNA akan mengganggu proses pembelahan sel sedangkan kerusakan mtDNA mengganggu rantai respirasi sel yang dapat menurunkan energi sel.<sup>[7]</sup>

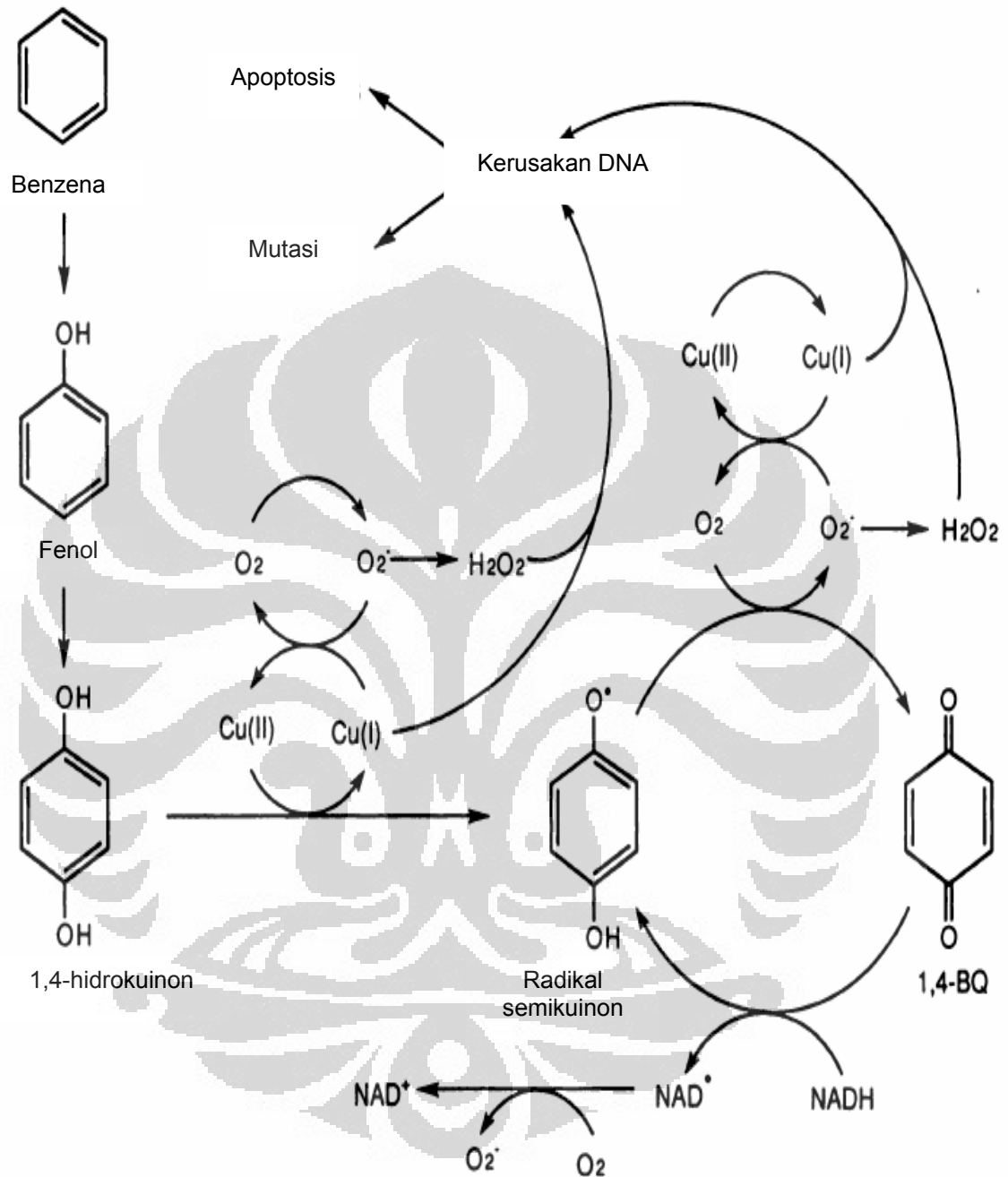
b. Kerusakan eksogenus

Selain pembentukan ROS terjadi dalam tubuh, manusia juga terpapar radikal bebas dari lingkungan secara terus menerus yang disebabkan oleh agen eksternal, seperti<sup>[5]</sup>:

1. radiasi ultraviolet (UV 200-300 nm) dari matahari dapat secara langsung mengionisasi molekul atau menghasilkan  $^1\text{O}_2$ , yang dapat mengoksidasi ikatan rangkap pada biomolekul
2. radiasi frekuensi lain, termasuk sinar-X dan sinar gamma
3. hidrolisis atau panas
4. toksin tanaman
5. bahan kimia mutagenik, khususnya senyawa aromatik yang berperilaku sebagai agen interkalasi DNA
6. kemoterapi dan radioterapi kanker

Senyawa-senyawa eksogenus bersifat toksik karena senyawa-senyawa ini termodifikasi oleh enzim seluler menjadi intermediet yang tidak stabil, yang kemudian bereaksi dengan molekul oksigen untuk menghasilkan produk awal dan produk radikal superoksida. Bahan-bahan kimia karsinogenik dari senyawa aromatik juga dapat menyebabkan oksidatif stress yang mengarah pada kerusakan DNA. Dalam tubuh, bahan karsinogenik ini mengalami aktivasi dalam hati pada proses detoksifikasi oleh sitokrom P450.

Menurut lembaga migas di Indonesia, bahan bakar yang tersedia dan dipasarkan di Indonesia mengandung 5% benzena, 50 % senyawa aromatik dan 20% senyawa olefin. Kandungan benzena dan senyawa aromatik dalam bahan bakar ini merupakan senyawa-senyawa eksogenus yang terdapat di lingkungan SPBU dan dapat menyebabkan terbentuknya ROS dalam tubuh.



**Gambar 2.2** Hasil metabolisme benzena oleh Sitokrom P450 dapat mengakibatkan kerusakan DNA. (Sumber: *Cancer Research*. 1996)<sup>[9]</sup>





2. alkilasi basa-basa (biasanya metilasi) seperti pembentukan 7-metilguanin, 1-metiladenin, dan O<sup>6</sup> metilguanin.
3. hidrolisis basa-basa seperti deaminasi, depurinasi, dan depirimidinasasi.
4. *mismatch* basa-basa karena kesalahan replikasi DNA, basa DNA yang salah menempel pada tempat strand DNA baru atau sebuah basa DNA dilompati atau salah terinsersi.

Kerusakan DNA yang disebabkan agen eksogenus dapat berasal dari berbagai sumber, contohnya<sup>[5]</sup>:

1. sinar UV-B menyebabkan *crosslinking* antara basa sitosin dan timin menghasilkan dimer pirimidin. Kerusakan ini disebut kerusakan DNA secara langsung.
2. sinar UV-A menghasilkan radikal bebas, khususnya jika *sunscreen* terserap ke dalam kulit. Kerusakan disebabkan oleh radikal bebas disebut kerusakan DNA secara tidak langsung.
3. radiasi ionisasi seperti yang terjadi akibat radioaktif dan sinar kosmik menyebabkan putusnya kedua *strand* DNA.
4. kerusakan akibat panas pada suhu tinggi meningkatkan laju depurinasi (kehilangan basa purin dari *backbone* DNA) dan untaian tunggal pecah. Sebagai contoh, depurinasi hidrolitik yang terdapat pada bakteri termofilik, yang tumbuh pada sumber air panas pada 85-250 °C. Laju depurinasi terlalu tinggi untuk dapat diperbaiki.

5. bahan kimiawi industri seperti vinil klorida dan hidrogen peroksida dan bahan kimiawi di lingkungan seperti hidrokarbon polisiklik yang ditemukan pada asap, jelaga, dan aspal menghasilkan diversitas yang besar dari DNA *adduct* etenobasa, basa teroksidasi, fosfotriester teralkilasi dan *crosslinking* DNA.

### 2.3 Kreatinin

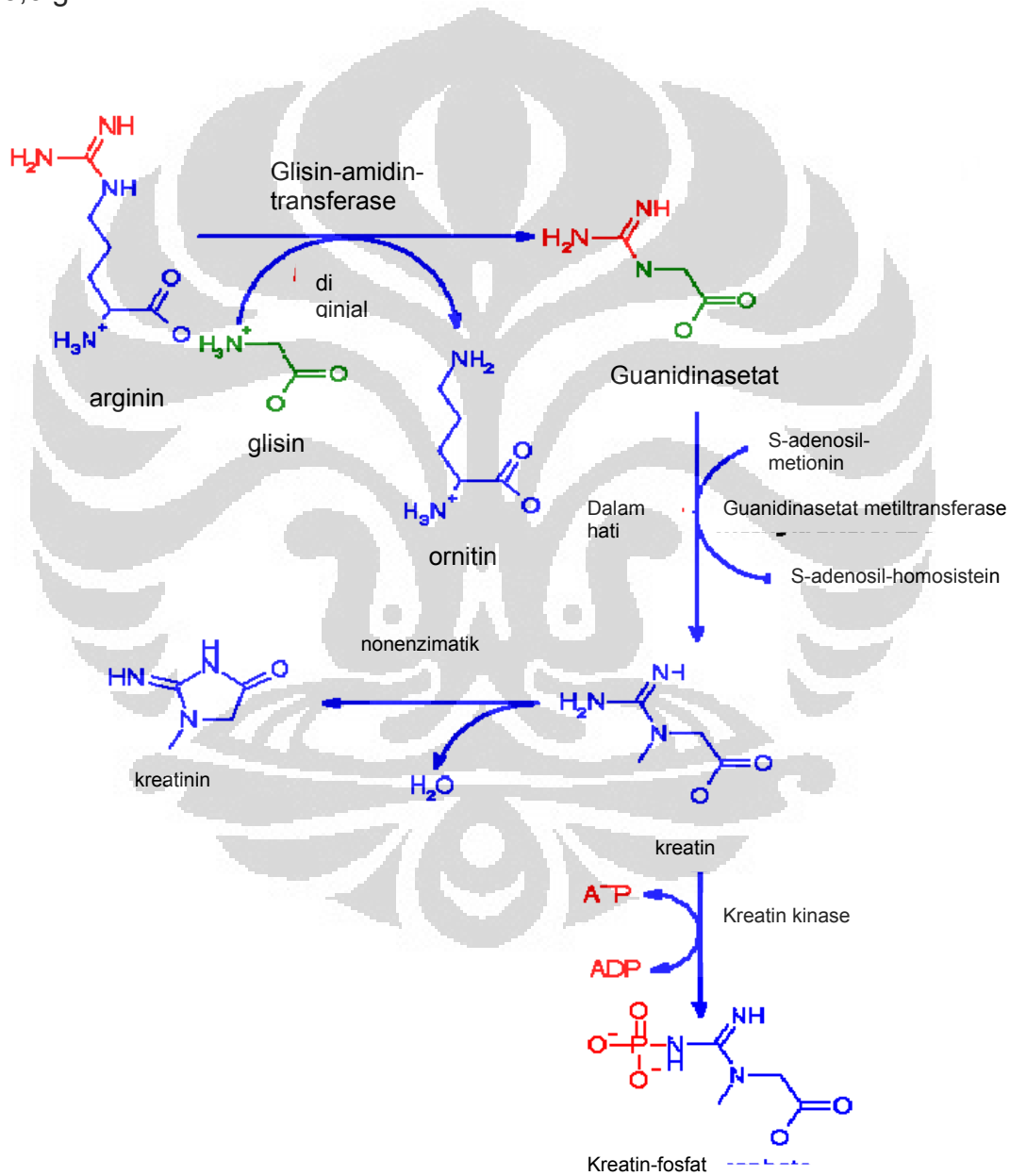
Kreatinin merupakan produk hasil pemecahan kreatin fosfat pada otot dan biasanya dihasilkan dengan laju konstan bergantung pada berat tubuh. Kandungan kreatinin dalam darah dan urin dapat digunakan untuk mengetahui keadaan fungsi ginjal.

Kreatinin disintesis dari asam amino arginin dan glisin yang mengalami reaksi di dalam ginjal dengan adanya enzim glisin-amidino-transferase dan ornitin membentuk guanidinasetat. Kreatin disintesis di hati dengan metilasi guanidinasetat menggunakan SAM (S-adenosilmetionin) sebagai donor metil.

Kreatin dapat mengalami reaksi dalam tubuh secara enzimatis dan non-enzimatis. Pada reaksi enzimatis, fosfat dari ATP (Adenosin Trifosfat) ditransfer ke kreatin menghasilkan kreatin fosfat oleh kreatin fosfokinase. Reaksi ini bersifat reversibel. Saat kebutuhan energi tinggi, kreatin fosfat mendonorkan fosfatnya kepada ADP (Adenosin Difosfat) untuk membentuk ATP. Pada reaksi non-enzimatis, kreatinin dibentuk di otot dari kreatin dengan dehidrasi dan kehilangan fosfat. Jumlah kreatinin yang dihasilkan berhubungan dengan

massa otot dan tetap konstan. Kreatinin diekskresikan oleh ginjal dan level ekskresi (laju pembersihan kreatinin) merupakan ukuran dari fungsi ginjal.

Kreatinin dapat ditentukan dengan metode *de Jaffe* dengan pembentukan kompleks Janovsky. Menurut WHO, range kreatinin adalah 0,3-3,0 g/L. <sup>[10, 11]</sup>

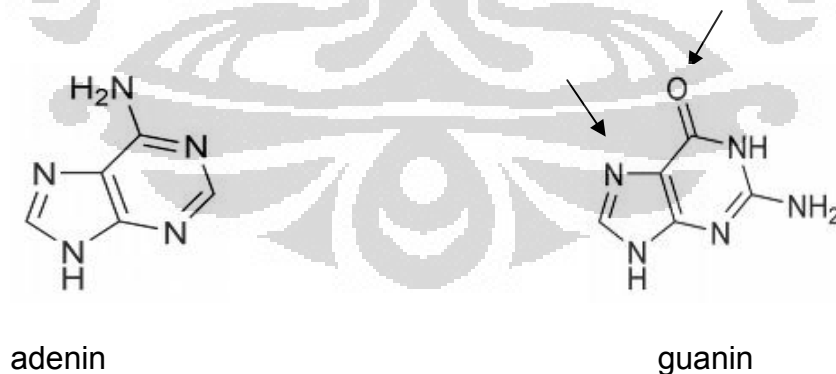


**Gambar 2.4** Sintesa kreatin dan kreatinin<sup>[12]</sup>

## 2.4 Biomarker Kerusakan DNA

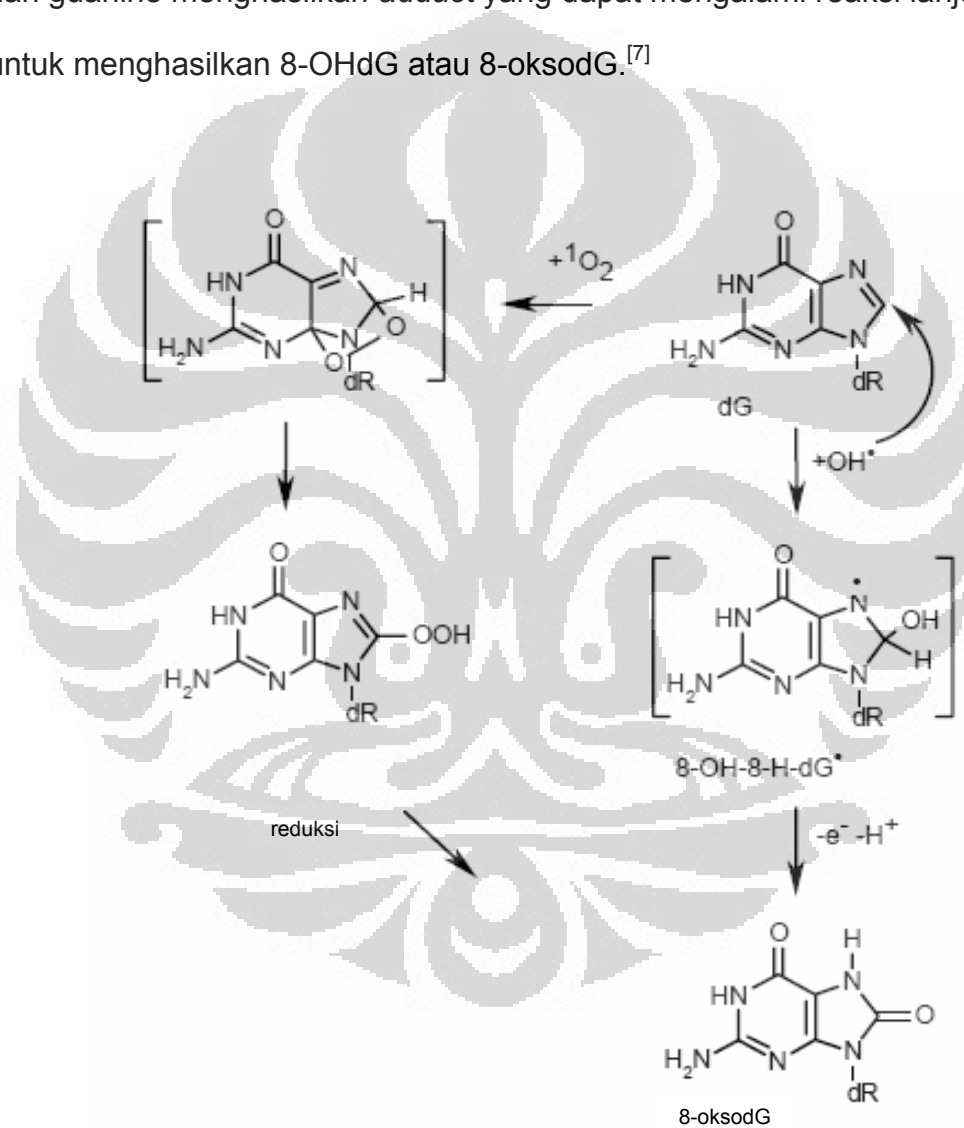
*Biomarker* adalah suatu senyawa spesifik yang digunakan sebagai penanda terjadinya paparan bahan-bahan toksik, baik pada tingkat individu maupun pada populasi masyarakat. *Biomarker* menunjukkan suatu kerusakan dalam fisiologi dari yang normal dan dapat digunakan sebagai suatu alat pengukuran kuantitatif dari homeostasis biologi yang membedakan antara yang abnormal dengan yang normal.

Pada penelitian ini, digunakan DNA *adduct* sebagai *biomarker* akibat kerusakan DNA akibat paparan stress oksidatif. DNA *adduct* merupakan DNA yang mengalami modifikasi akibat adanya interaksi kovalen antara zat kimia dengan basa-basa DNA menghasilkan senyawa baru. Interaksi dapat berupa alkilasi, arilasi, maupun pembentukan suatu senyawa yang memiliki struktur gabungan antara basa DNA dengan zat kimia tersebut. Salah satu bentuk DNA *adduct* lainnya adalah kerusakan oksidatif pada basa-basa DNA.



**Gambar 2.5** Basa-basa DNA yang reaktif

Dari keempat basa, guanin memiliki potensial oksidasi terendah sehingga paling mudah teroksidasi. Kerusakan yang terbanyak dari oksidasi guanin adalah 2,6-diamino-4-hidroksi-5-formamidopirimidin (fapyG) dan 8-hidroksi-7,8- dihidro-2'-deoksiguanosin (8-OHdG). Adisi  $\cdot\text{OH}$  pada posisi 8 dari guanine menghasilkan *adduct* yang dapat mengalami reaksi lanjutan untuk menghasilkan 8-OHdG atau 8-oksodG.<sup>[7]</sup>



**Gambar 2.6** Jalur oksidasi guanin oleh radikal OH. <sup>[7]</sup>

**Tabel 1.** Korelasi antara mutasi yang diamati dan kerusakan oksidatif DNA yang spesifik<sup>[7]</sup>

Substitusi basa yang diamati	DNA adduct yang terbentuk
GC→AT	5-OHdC, 5-OHdU, dUg
GC→TA	8-OHdG
GC→CG	5-OHdC
AT→CG	8-OHdA, 8-OHdG
AT→GC	dTg, 8-OHdA, 2-OHdA
AT→TA	2-OHdA

Berikut adalah mekanisme perbaikan pada kerusakan DNA *single strand* yang memberikan kontribusi pada ekskresi 8-OHdG dalam urin. Perbaikan penghilangan basa (*Base Excision Repair*, disingkat BER) memperbaiki kerusakan pada satu nukleotida yang disebabkan oleh oksidasi, alkilasi, hidrolisis atau deaminasi. Basa dipotong oleh glikosilase dan digantikan dengan sintesa perbaikan dengan DNA ligase. Berikut adalah tahapan BER<sup>[5,13]</sup>:

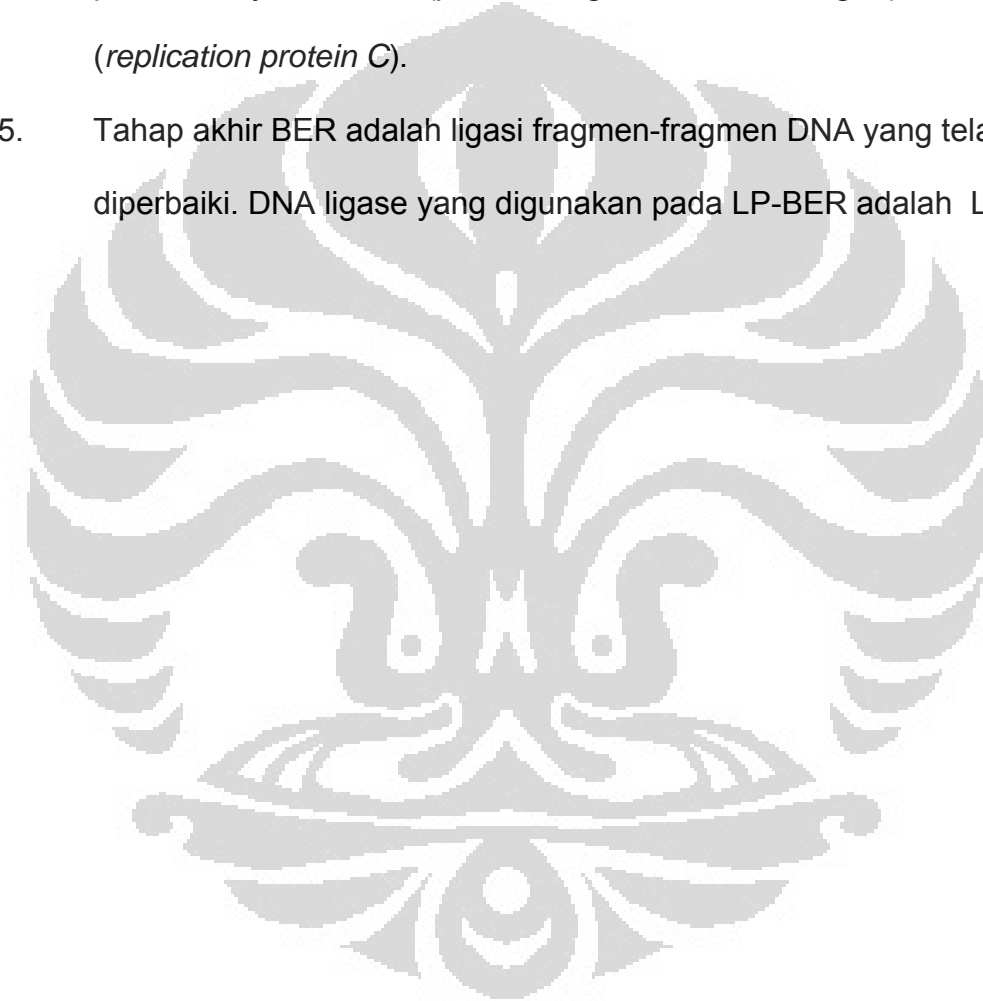
1. pemotongan satu basa tunggal oleh DNA glikosilase, meninggalkan unit deoksiribosa dan membentuk sisi apurin atau apirimidin (AP). Pada manusia, 8-oksoguanin DNA glikosilase adalah hOgg1/hMMH.
2. Sisi AP terinsisi oleh AP endonuklease atau AP liase, memutus untai DNA pada tempat dimana basa dipotong.

3. PARP1 (*poliADP ribose polymerase*), berikatan dengan ujung DNA yang bebas dan melindungi dari degradasi, berpartisipasi dalam relaksasi kromatin dan mungkin memodulasi pengikatan protein yang memperbaiki pada sisi yang rusak.
4. a. Pada perbaikan pendek (*Short Patch Base Excision Repair*, disingkat SP-BER), satu nukleotida yang hilang yang diinkorporasi oleh DNA polymerase  $\beta$  ( $\text{pol } \beta$ ), yang juga memiliki aktivitas 5' dRPase dan dapat menghilangkan gula yang tidak memiliki basa dari sisi 5' dari kerusakan DNA.

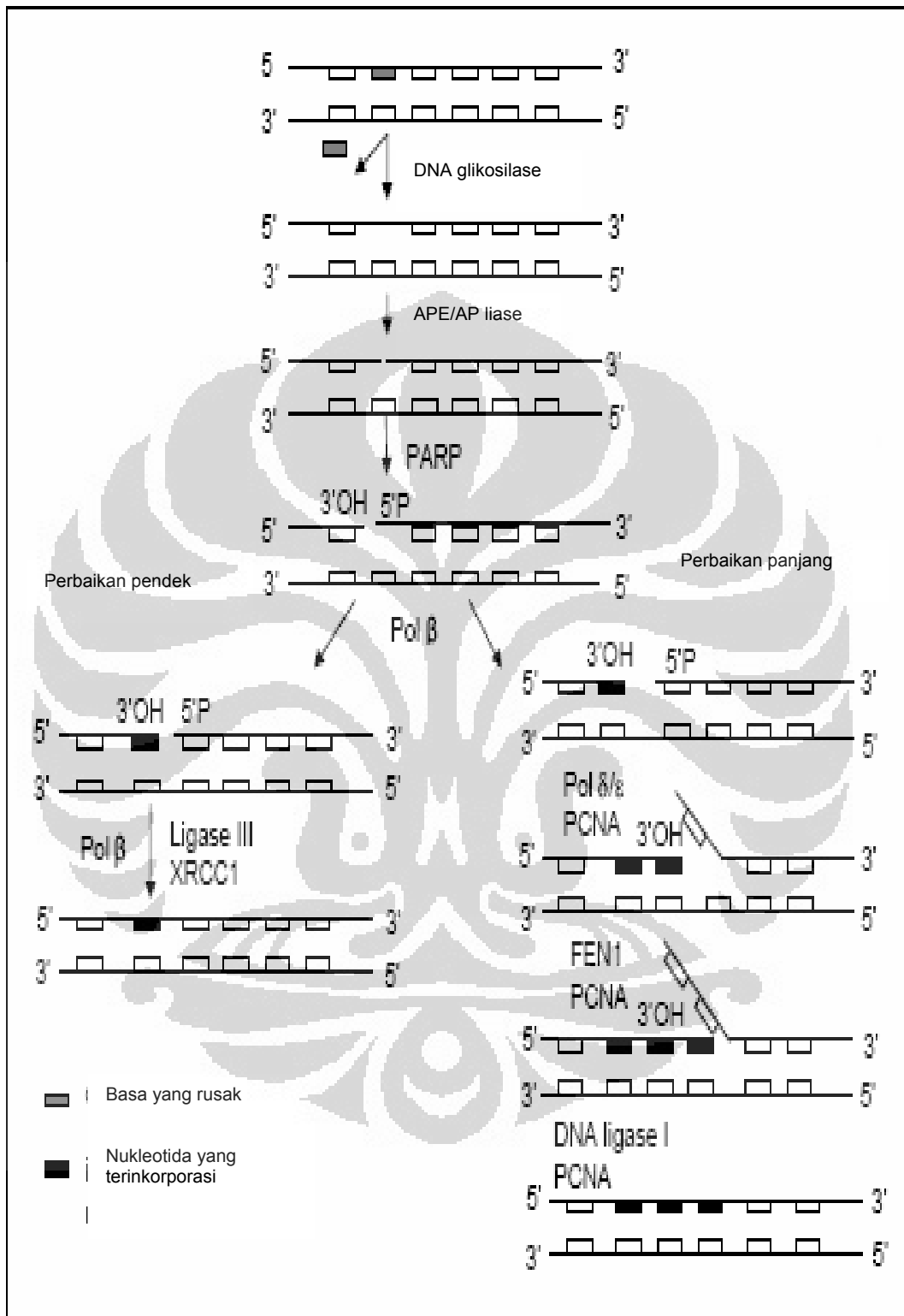
LIG3 $\alpha$  tetap berada dalam bentuk kompleks dengan protein XRCC1, yang mengaktifasi ligasi ujung-ujung DNA dengan LIG3 $\alpha$ . XRCC1 adalah protein *platform* dan berperan mengkoordinasi tahap yang berturut-turut dari sistem BER. XRCC1 ditempatkan pada sisi DNA yang rusak oleh beberapa DNA glikosilase, seperti OGG1 atau NTH1 dan tetap berada pada sisi perbaikan hingga tahap akhir ligasi, regulasi, dan koordinasi proses keseluruhan. XRCC1 memfasilitasi pergantian DNA glikosilase dengan AP-endonuklease pada substrat yang rusak, dimana meningkatkan laju eksisi dari basa yang termodifikasi, mengatur interaksi  $\text{pol } \beta$  dengan APE1 dan akhirnya mengaktifasi tahap ligasi.
- b. Pada perbaikan panjang (*Long Patch Base Excision Repair*, disingkat LP-BER), fragmen yang lebih panjang (2-12 nukleotida) dihilangkan dan disintesa kembali. DNA polymerase memperpanjang

ujung 3' dan menghilangkan fragmen DNA yang mengandung 5' deoksiribofosfat. Pada LP-BER, nukleotida pertama diinkorporasi oleh DNA polymerase  $\beta$ , kemudian dengan DNA polymerase  $\delta$  atau  $\epsilon$ . LP-BER juga menggunakan protein lain untuk membantu proses perbaikan, yaitu PCNA (*proliferating cell nuclear antigen*) dan RPC (*replication protein C*).

5. Tahap akhir BER adalah ligasi fragmen-fragmen DNA yang telah diperbaiki. DNA ligase yang digunakan pada LP-BER adalah *LIG1*.





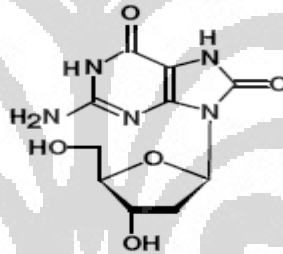


**Gambar 2.7** Mekanisme BER (*Base Excision Repair*)<sup>[5, 13]</sup>

## 2.5 DNA Adduct 8-hidroksi-2'-deoksiguanosin sebagai

### Biomarker Kerusakan DNA

8-OHdG (atau 8-oksodG atau 8-okso-7,8-dihidro-2'-deoksiguanosine) merupakan kerusakan DNA yang dibentuk dari adisi radikal hidroksil pada posisi C-8 dari guanin pada DNA. Deteksi kerusakan ini penting karena kelimpahannya dalam urin dan potensi mutageniknya dalam tubuh dapat merupakan indikator yang baik untuk spesies oksigen reaktif dan biomarker karsinogenesis *in vivo* yang potensial.<sup>[13]</sup>



**Gambar 2.8** 8-okso-dG: 8-okso-7,8-dihidro-2'-deoksiguanosin (juga dikenal sebagai 8-hidroksi-2'-deoksiguanosin; 8-okso-2'-deoksiguanosin)

8-OHdG berguna untuk mengindikasikan resiko kanker dan penyakit yang berkaitan dengan oksidatif stress lainnya.<sup>[14,15]</sup> Lebih lanjut, ekskresi 8-OHdG melalui urin dapat meningkat karena paparan karsinogen di lingkungan/lingkungan kerja.

8-OHdG dapat dianalisis dengan metode ELISA, HPLC-ECD, HPLC-UV, GC-MS, HPLC-GC/MS, dan LC-MS-MS.<sup>[1]</sup>

Konsentrasi rata-rata 8-OHdG pada orang sehat sekitar 2,1-4,0  $\mu\text{g/g}$  kreatinin dengan pengukuran alat SPE HPLC-ECD atau LC-LC-ECD sedangkan konsentrasi rata-rata 8-OHdG pada perokok sekitar 3,6-7,8  $\mu\text{g/g}$  kreatinin.<sup>[1]</sup>

Pada studi yang dilakukan di Jepang dengan metode HPLC-UV, level 8-OHdG berkisar dari 1,2-11,4  $\mu\text{g/g}$  kreatinin, dengan median 3,9  $\mu\text{g/g}$  kreatinin. Rata-rata geometris 8-OHdG untuk nonperokok adalah 3,70  $\mu\text{g/g}$  kreatinin, untuk perokok ringan adalah 4,50  $\mu\text{g/g}$  kreatinin sedangkan untuk perokok berat (rutin) adalah 4,52  $\mu\text{g/g}$  kreatinin. Rata-rata geometris 8-OHdG untuk pria non perokok adalah 3,68  $\mu\text{g/g}$  kreatinin dan untuk wanita non perokok adalah 3,74  $\mu\text{g/g}$  kreatinin (dengan umur rata-rata pria 42 tahun dan rata-rata umur wanita 39 tahun).<sup>[2]</sup>

**Tabel 2.** Karakteristik fisik dan kimia dari 8-hidroksi-7,8-dihidro-2'-  
deoksiganosin<sup>[16,17]</sup>

Rumus Molekul	$C_{10}H_{13}N_5O_5$
Berat Molekul	283,24 gram/mol
Kelarutan dalam air	<50 µg/mL pada 25 °C
Bentuk	Padatan kristalin
Penyimpanan	Stabil selama 1 tahun dalam pelarut air pada 2-8°C
Kestabilan	Stabil
Inkompatibel	Kondisi asam ekstrim dapat menyebabkan senyawa ini terdeglikosilasi
Kondisi penyimpanan	Disimpan rapat
TLV (ACGIH)	Tidak tercantum
PEL (OSHA)	Tidak tercantum
Data Toksisitas	Sifat toksik dari senyawa ini belum diteliti
Efek paparan	Iritasi kulit, mata, hidung, tenggorokan dan saluran pernapasan
Prosedur pertolongan pertama	-Jika tertelan, segera beri pertolongan medis. -Jika terjadi kontak dengan mata, bilas dengan air dan beri pertolongan medis. -Jika terhirup, segera mencari udara segar dan pertolongan medis.
Tindakan Pencegahan	Gunakan pengaman (baju laboratorium, sarung tangan dan pelindung mata).
Prosedur penanganan tumpahan 8-OHdG	Bersihkan tumpahan dengan material absorban dan buang pada tempat yang aman.

## **BAB III**

### **METODE PENELITIAN**

#### **3.1 Lokasi Penelitian**

Pengambilan sampel dilakukan di area Stasiun Pengisian Bahan Bakar (SPBU) di daerah DKI Jakarta.

Berikut adalah daftar lokasi SPBU yang dipilih untuk pengambilan sampel secara representatif dari kelima wilayah di DKI Jakarta:

- Wilayah Jakarta Barat:  
SPBU 34-11709. Jl. Daan Mogot
- Wilayah Jakarta Pusat:  
SPBU 34-10401. Jl. Gunung Sahari  
SPBU 34-13701. Jl. Matraman Raya (Dekat Gramedia)
- Wilayah Jakarta Selatan:  
SPBU 31-12902. Jl. Rasuna Said  
SPBU 34-12603. Jl. Raya Lenteng Agung
- Wilayah Jakarta Timur:  
SPBU 34-13419. Jl. Raden Inten
- Wilayah Jakarta Utara:  
SPBU 34-14103.  
SPBU 34-14208.

## **3.2 Alat dan Bahan**

### **3.2.1 Alat**

Peralatan laboratorium yang digunakan adalah, alat-alat gelas yang biasa digunakan di laboratorium, botol polietilen, botol kaca coklat ukuran 10 mL, botol kaca coklat ukuran 100 mL, botol kaca bening ukuran 100 mL, styrofoam pengangkut, es, baskom, pipet mikro 200  $\mu$ L dan 1000  $\mu$ L, sentrifugator dan tabung sentrifuge, timbangan, pH meter, pompa vakum.

Peralatan analisis yang digunakan adalah satu set peralatan HPLC-detektor UV, dan satu set peralatan UV.

### **3.2.2 Bahan**

Serbuk 8-OHdG diperoleh dari Sigma Co. Ltd, kreatinin, metanol HPLC, akuabides, asam pikrat jenuh, serbuk Na-asetat, serbuk Na-fosfat, larutan H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> pekat, larutan HCl pekat, dan padatan NaOH.

### **3.2.3 Sampel**

Sampel urin dikumpulkan dari 30 orang yang tidak bekerja di SPBU dan 32 orang petugas SPBU wanita, berumur 18-25 tahun, tidak mengkonsumsi rokok, serta tidak memiliki riwayat kesehatan yang buruk terkait dengan penyakit ginjal, diabetes, dan jantung yang dapat diketahui dengan melakukan *survey* status kesehatan partisipan. Sampel urin diambil secara acak sebanyak 8 sampel dari orang yang tidak bekerja di SPBU dan 16 sampel dari petugas SPBU.

### **3.3 Metode Kerja**

#### **3.3.1 Pengambilan Sampel**

Pengambilan masing-masing sampel urin dari responden dikumpulkan pada akhir shift kerja. Masing-masing sampel urin kemudian disimpan dalam *cooler box* pada 4°C sampai waktu analisis.

#### **3.3.2 Verifikasi Metode**

Sebelum analisis sampel, dilakukan verifikasi terhadap metode analisis yang dilakukan oleh Tetsuya Mizoue, et al dengan modifikasi sesuai dengan peralatan yang ada. Metode analisis yang digunakan dalam penentuan *biomarker* 8-OHdG diverifikasi atau dipastikan kelayakannya sesuai dengan kondisi peralatan dan bahan yang digunakan pada saat penelitian. Verifikasi metode analisis yang digunakan meliputi kondisi optimal, presisi, persentase perolehan kembali, penentuan batas deteksi alat dan zat (LOD), batas kuantisasi (LOQ), dan lain-lain, yang diperlukan dalam rangka menunjang data semasa penelitian.

#### **3.3.3 Analisis Sampel**

##### **3.3.3.1 Analisis Jumlah Kreatinin**

Analisis kreatinin dilakukan dengan menggunakan metode *de Jaffe*, berdasarkan perubahan warna kompleks kreatinin-pikrat.

### **3.3.3.1.1 Pembuatan Larutan Standar Kreatinin**

Untuk standar, mula-mula dibuat larutan stok standar kreatinin 25 g/L (ppm) dalam HCl 0,1 M pada labu ukur 10 mL, kemudian dibuat deret standar dengan variasi konsentrasi 0; 0,1; 0,3; 0,5; 1; 2; 4 g/L.

### **3.3.3.1.2 Analisis Kreatinin pada Sampel Urin**

Sampel urin disentrifugasi, agar sedimen urin terpisahkan, kemudian 0,1 mL dari masing-masing sampel urin ditambahkan dengan 1 mL NaOH 1 mol/L dan 0,5 ml asam pikrat jenuh. Setelah didiamkan selama 10 menit, larutan diencerkan dengan dalam labu ukur 25 mL dan dikocok hingga homogen. Larutan siap diukur absorbansinya dengan Spektrofotometer UV-Visible pada 486 nm.

### **3.3.3.2 Analisis Metabolit 8-OHdG sebagai Biomarker Oksidatif Stress**

#### **3.3.3.2.1 Pembuatan Larutan Stok 8-OHdG**

Larutan stok 8-OHdG 100 mg/L dibuat dengan melarutkan 1 mg serbuk 8-OHdG dalam labu 10 mL. Kemudian larutan stok 8-OHdG 100 mg/L diencerkan menjadi 100 µg/L (standar sekunder). Larutan stok disimpan pada 4 °C dan standar yang diencerkan dipreparasi setiap hari.

#### **3.3.3.2.2 Kondisi Optimal untuk HPLC**

Dilakukan pengukuran standar 8-OHdG 10 mg/L sebanyak 20 µL berkali-kali dengan komposisi eluen yang divariasikan dan waktu retensi yang



tetap. Eluen yang digunakan berupa metanol dan buffer fosfat 10 mmol/liter pH = 6,7 dengan laju alir 1 mL/menit.

#### **3.3.3.2.3 Kurva Kalibrasi**

Setelah diperoleh kondisi optimum, dilakukan pengukuran beberapa sampel sebanyak 20  $\mu$ L untuk melihat *range* konsentrasi 8-OHdG dalam sampel. Setelah mendapat *range* konsentrasi 8-OHdG dalam sampel, dibuat deret standar yang mencakup konsentrasi 8-OHdG dalam sampel.

#### **3.3.3.2.4 Limit Deteksi (LOD) dan Limit Kuantifikasi (LOQ)**

Ukur 8-OHdG dengan konsentrasi tertentu hingga konsentrasi terkecil yang tidak terdeteksi dan terkuantifikasi oleh alat.

#### **3.3.3.2.5 Presisi**

Larutan 8-OHdG dengan konsentrasi 1, 5 dan 10 mg/L diinjek sebanyak 20  $\mu$ L ke dalam kolom HPLC dengan kondisi optimal dan pengukuran diulang sebanyak enam kali, kemudian mencatat luas puncak dan menghitung koefisien variasi.

#### **3.3.3.2.6 Perolehan Kembali**

Larutan 8-OHdG dengan konsentrasi tertentu diperlakukan seperti sampel dan diinjeksikan sebanyak 20  $\mu$ L ke dalam kolom dan dielusi dengan perbandingan eluen yang optimal.

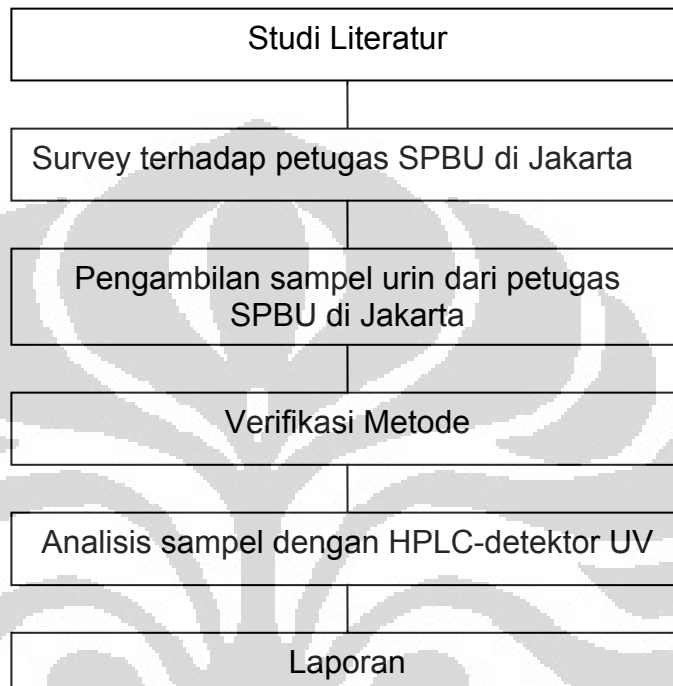
### 3.3.3.2.7 Analisis Metabolit 8-OHdG dalam Sampel Urin

Sampel urin yang membeku dicairkan dan 500  $\mu\text{L}$  dari masing-masing sampel dicampurkan dengan 500  $\mu\text{L}$  larutan yang mengandung larutan Na-asetat 130 mmol/L (pH = 4,5) dan 0,6 mmol/L  $\text{H}_2\text{SO}_4$ . Larutan urine kemudian didiamkan selama 2 jam pada suhu 4  $^\circ\text{C}$ . Larutan urin disentrifugasi pada 3.000 rpm selama 5 menit, dan disaring.

Supernatan sebanyak 20  $\mu\text{L}$  dari masing-masing larutan urin diinjeksikan ke HPLC (LichroCART®(MERCK) RP-C18 (4,6  $\times$ 250mm, 5  $\mu\text{m}$ ) dari *sampling injector* dan kromatogram direkam dengan detektor UV pada 254 nm dengan eluen methanol : buffer fosfat pH 6,7 10 mmol/L dengan laju alir 1 mL/menit. Kuantifikasi 8-OHdG dilakukan dengan mengukur luas puncak berdasarkan plot kalibrasi dari luas puncak standar 8-OHdG pada berbagai konsentrasi.

### 3.4 Bagan Penelitian

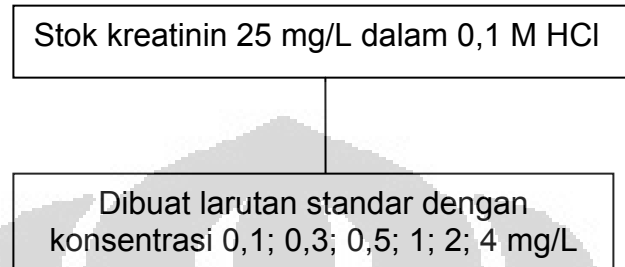
#### 3.4.1 Skema Umum Penelitian



**Gambar 3.1** Skema Penelitian

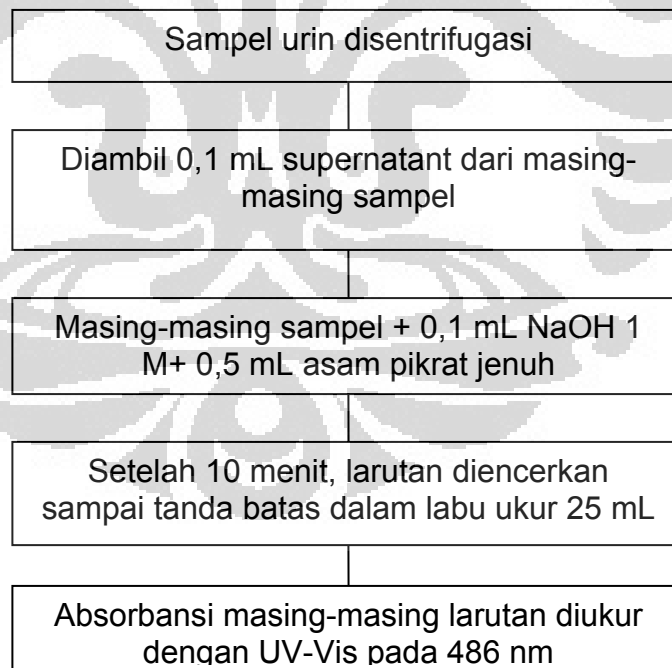
### 3.4.2 Skema Kerja Kreatinin

#### 3.4.2.1 Pembuatan Larutan Standar Kreatinin



**Gambar 3.2** Skema pembuatan larutan standar kreatinin

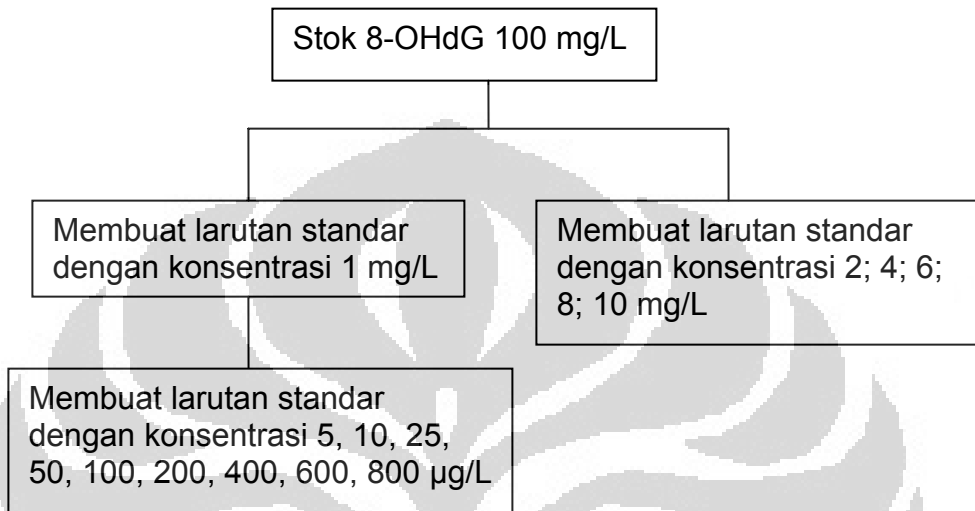
#### 3.4.2.2 Analisa Kreatinin dalam Sampel



**Gambar 3.3** Skema analisa kreatinin dalam sampel urin

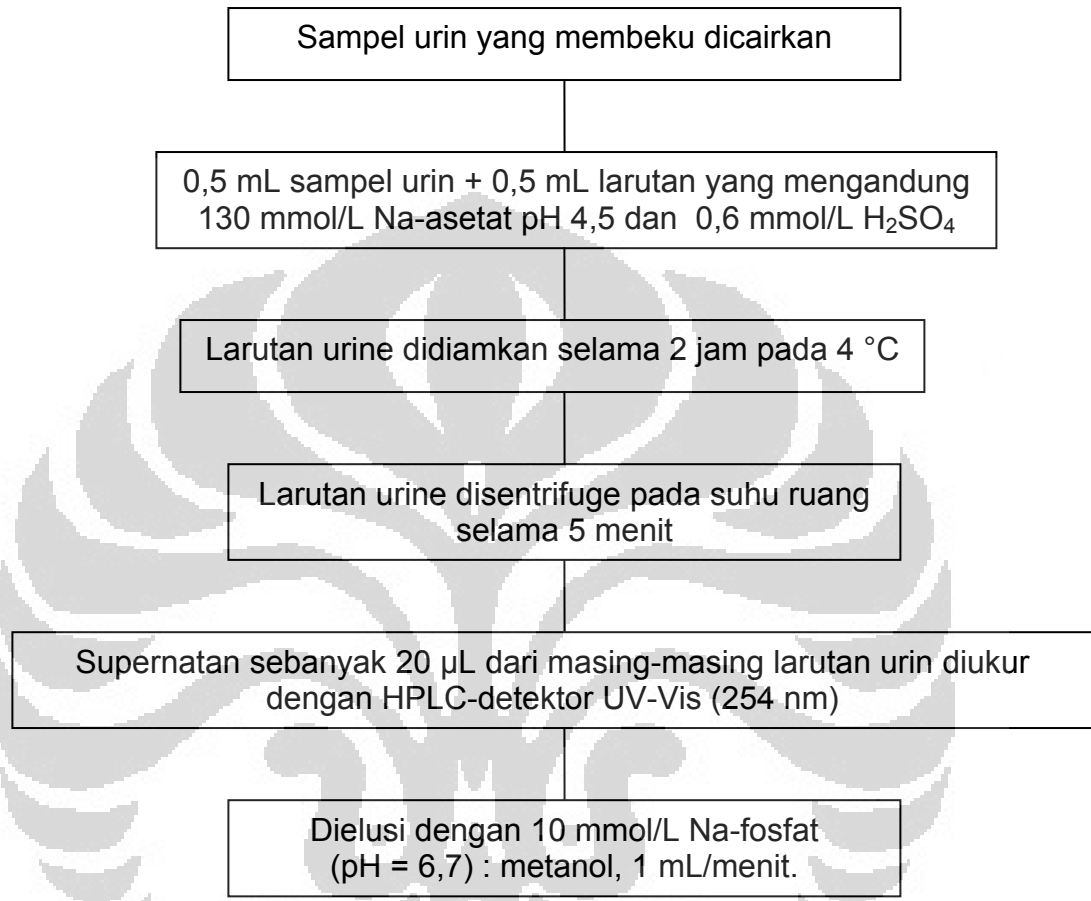
### 3.4.3 Skema Kerja 8-OHdG

#### 3.4.3.1 Pembuatan Larutan Standar 8-OHdG



**Gambar 3.4** Skema kerja pembuatan deret standar 8-OHdG

### 3.4.3.2 Analisis 8-OHdG dalam Sampel Urin



**Gambar 3.5** Skema kerja pengukuran 8-OHdG dalam urin

## BAB IV

### HASIL DAN PEMBAHASAN

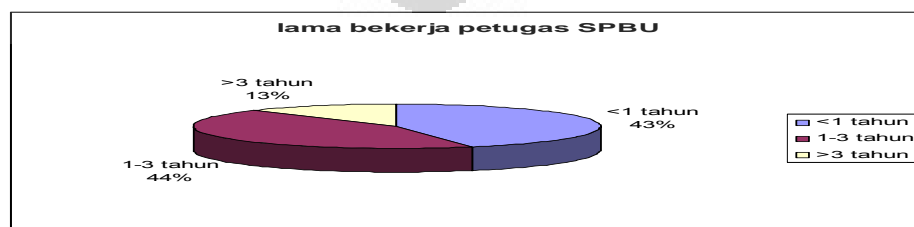
#### 4.1 Deskripsi Sampel

Penelitian ini dilakukan untuk mendeteksi *biomarker* akibat paparan ROS dari metabolisme zat-zat eksogenus yang berasal dari lingkungan kerja dalam kaitannya dengan studi risiko kanker akibat kerusakan DNA. Oksidatif stress merupakan paparan yang tak diinginkan dari spesi oksigen reaktif (*Reactive Oxygen Species*, ROS) yang bersumber dari bahan karsinogenik dan terjadi akibat ketidakseimbangan antara prooksidan dan antioksidan yang mengacu pada kerusakan sel (kerusakan lipid, protein, karbohidrat dan asam nukleat) dan kerusakan jaringan. [18, 19, 20, 21]

Potensi keberadaan spesies oksigen reaktif di lingkungan DKI Jakarta cenderung sangat tinggi. Paparan akibat ROS ini dapat disebabkan oleh polusi udara, asupan makanan, maupun paparan zat karsinogen di lingkungan kerja. Potensi kerusakan DNA dapat terjadi bila seseorang terpapar zat karsinogen yang terjadi secara terus menerus. Jika udara mengandung zat karsinogen, seperti benzena pada areal SPBU, maka potensi terjadinya kerusakan DNA akan meningkat pada petugas SPBU. Karena itu, kami memilih petugas SPBU sebagai model untuk studi pengkajian paparan ROS, terkait dengan risiko terjadinya kerusakan DNA dengan menggunakan *biomarker DNA-Adduct*.

Sampel sebanyak 16 dipilih secara acak dari total sampel petugas SPBU wanita yang berjumlah 32 sampel, dengan usia antara 20-29 tahun yang bekerja di beberapa SPBU yang representatif di wilayah DKI Jakarta. Pemilihan SPBU di beberapa lokasi seperti dipaparkan sebelumnya didasarkan pada lalu lintas yang padat dan cukup ramai pengunjung. Pengambilan sampel dilakukan secara acak dengan sukarela dari responden. Data terkait riwayat kesehatan dan riwayat pekerjaan dicatat melalui kuesioner. Sampel petugas SPBU dikelompokkan menjadi tiga kelompok, yang bekerja kurang dari satu tahun, satu hingga dua tahun, dan tiga tahun hingga lebih dari tiga tahun. Sebagai kontrol, diambil 8 orang wanita yang tidak bekerja di lingkungan SPBU dari total 30 sampel dan tidak memiliki riwayat kesehatan yang buruk, sehat, dan tidak diketahui adanya sumber paparan seperti paparan pada lingkungan SPBU, dengan *range* usia 21-56 tahun. Kontrol diambil untuk dibandingkan dengan sampel SPBU melalui perhitungan statistik.

Gambaran lama bekerja pada kelompok petugas SPBU ditunjukkan pada Gambar 4.1.

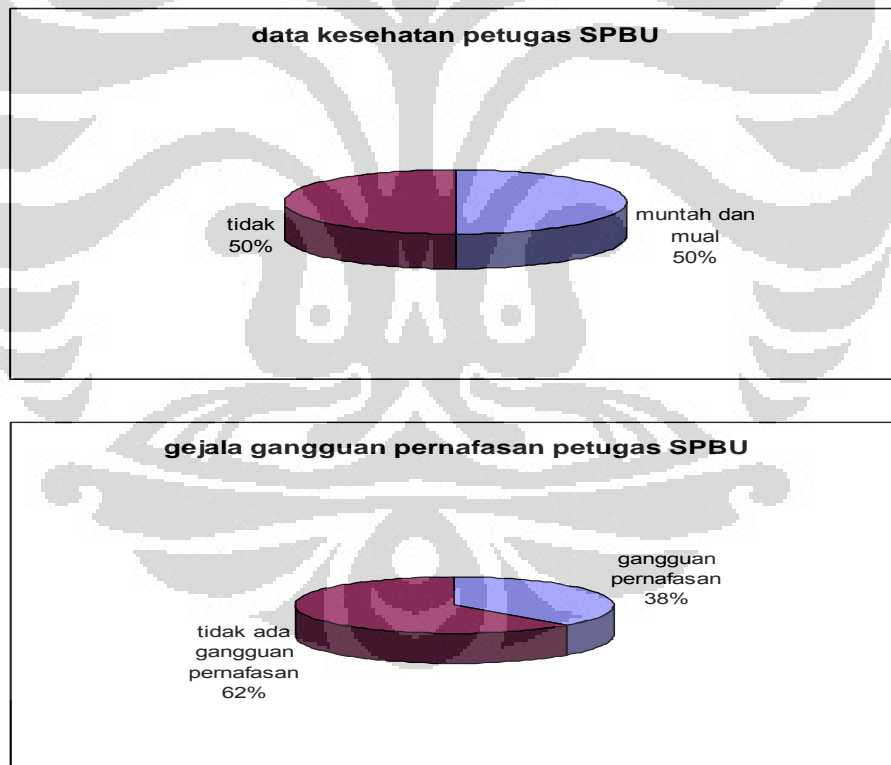


**Gambar 4.1** Persentase lama bekerja sampel kelompok petugas SPBU



Responden dari petugas SPBU bekerja tujuh hingga delapan jam per hari dan lima hingga enam hari per minggu.

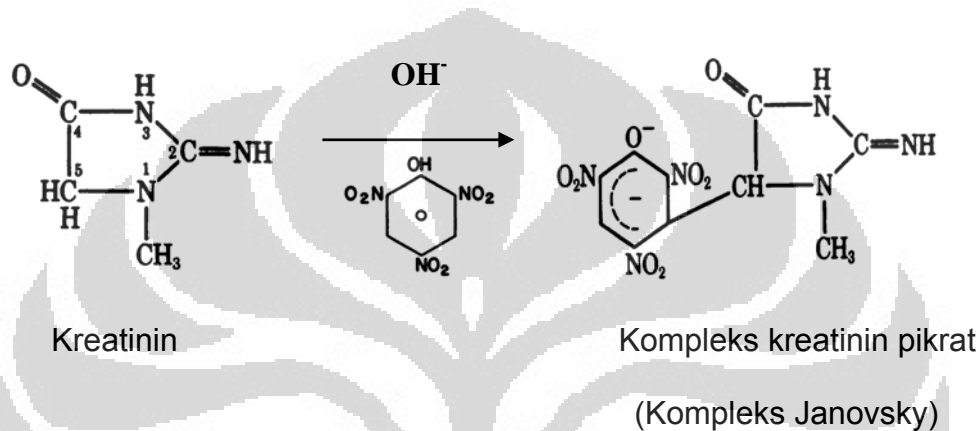
Berdasarkan kuesioner, selama bekerja di areal SPBU, sebanyak 38% petugas SPBU menyatakan mengalami gangguan pernafasan , 50% menyatakan mengalami muntah dan mual, sedangkan 31,25% menyatakan tidak pernah mengalami keluhan kesehatan seperti gangguan pernafasan maupun muntah dan mual. Persentase keluhan kesehatan petugas SPBU dapat dilihat pada Gambar 4.2.



**Gambar 4.2** Persentase keluhan kesehatan kelompok sampel petugas SPBU.

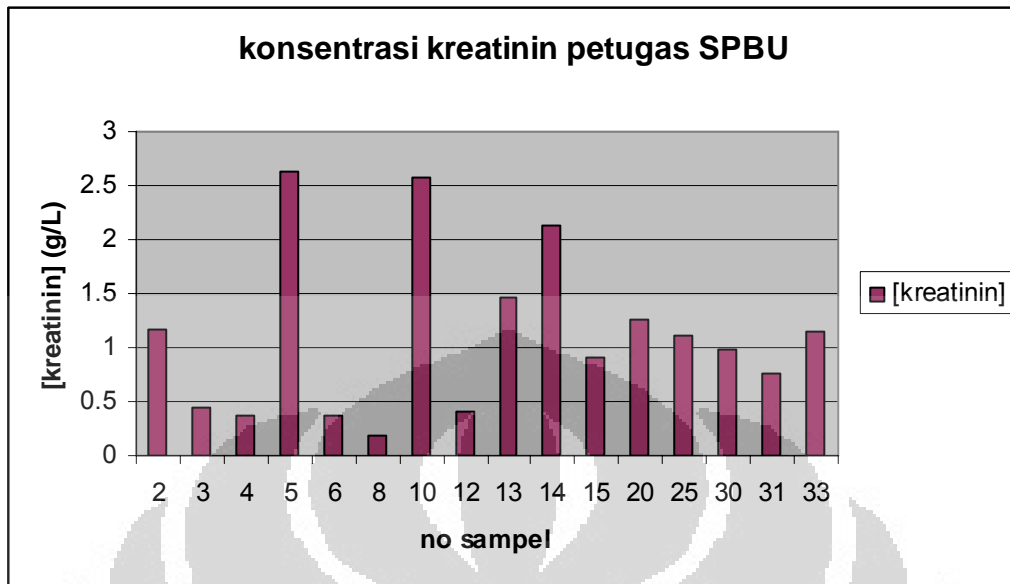
#### 4.1.1 Hasil Pengukuran Kreatinin

Pengukuran kreatinin dilakukan dengan metode de Jaffe dengan menggunakan reaksi kompleks kreatinin-pikrat (yang disebut dengan kompleks Janovsky) yang ditunjukkan pada Gambar 4.3.

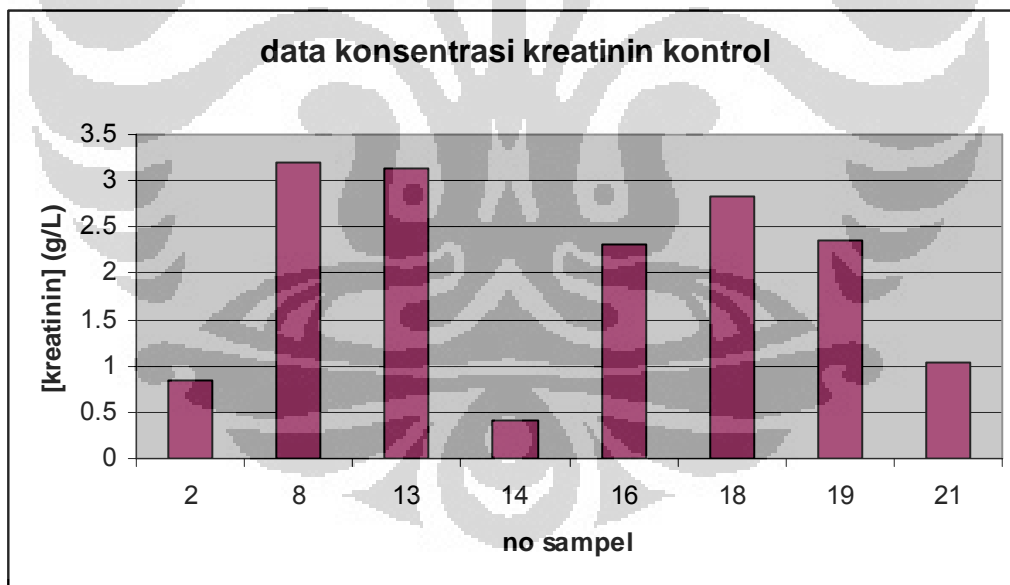


**Gambar 4.3** Reaksi kreatinin dengan asam pikrat dalam suasana basa menghasilkan kompleks Janovsky.<sup>[10, 11]</sup>

Dari hasil pengukuran dengan metode de Jaffe, diperoleh konsentrasi kreatinin dalam sampel urin petugas SPBU berkisar 0,1840-2,5723 g/L. Diagram batang konsentrasi kreatinin pada petugas SPBU dapat dilihat pada Gambar 4.4. Sedangkan konsentrasi kreatinin dalam sampel urin kontrol berkisar 0,4013-3,2083 g/L. Grafik konsentrasi kreatinin pada kontrol dapat dilihat pada Gambar 4.5.



**Gambar 4.4.** Diagram batang konsentrasi kreatinin pada petugas SPBU.



**Gambar 4.5.** Diagram batang konsentrasi kreatinin pada kontrol.

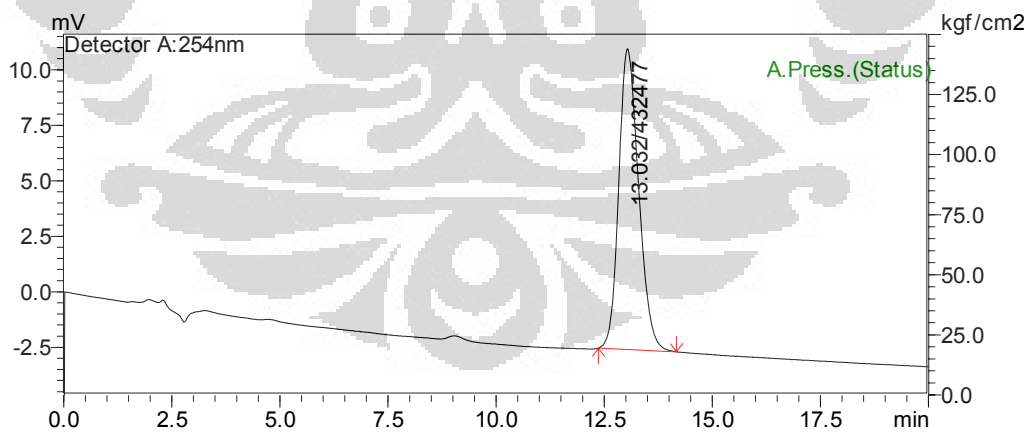
## 4.1.2 Verifikasi Metode Analisis 8-OHdG

### 4.1.2.1 Kondisi Optimum Analisis

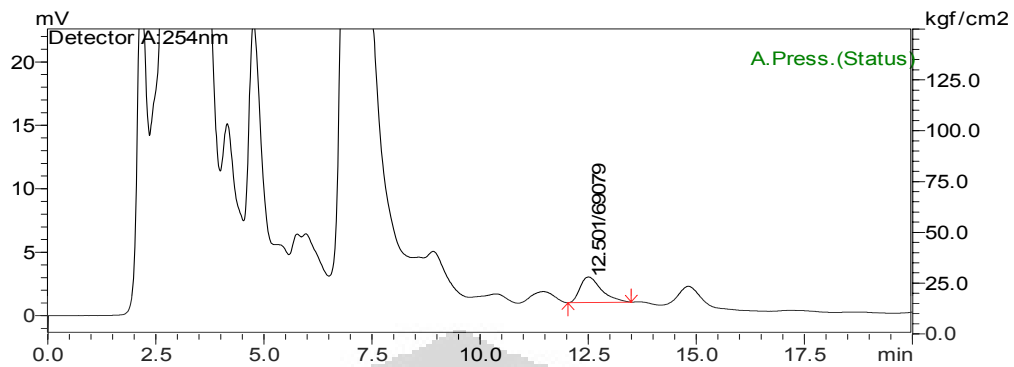
Untuk analisis 8-OHdG, diperoleh kondisi optimum sebagai berikut:

Instrumentasi	:	HPLC, Shimadzu LC-20AB
Kolom	:	LichroCART®(MERCK) RP-18, 5 µm, 4,6 ×250 mm
Detektor	:	UV-Vis, Shimadzu SPD-20A
Panjang gelombang	:	254 nm
Fasa gerak	:	Metanol: Buffer fosfat pH 6,7 10 mmol/liter
Laju alir	:	1 mL/menit
Volume injeksi	:	20 µL

Kromatogram standar 8-OHdG dapat dilihat pada Gambar 4.6.

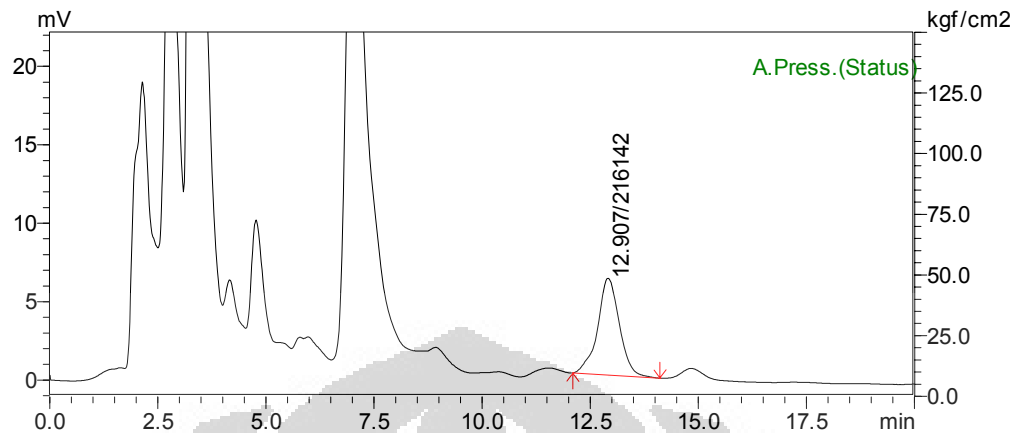


**Gambar 4.6** Kromatogram larutan standar 8-OHdG 10 mg/L pada perbandingan eluen metanol: buffer fosfat pH 6,7 = 10 : 90.



**Gambar 4.7** Kromatogram sampel urin pada perbandingan eluen metanol:  
buffer fosfat pH 6,7 = 10 : 90.

Gambar 4.7 menunjukkan kromatogram sampel urin yang diukur dengan alat HPLC dengan detector UV. Identifikasi posisi puncak 8-OHdG pada kromatogram sampel urin dilakukan dengan penambahan standar 8-OHdG ke dalam sampel urin. Adanya peningkatan intensitas dan luas puncak pada waktu retensi tertentu setelah penambahan standar 8-OHdG menunjukkan bahwa posisi puncak tersebut adalah puncak untuk 8-OHdG pada sampel urin.

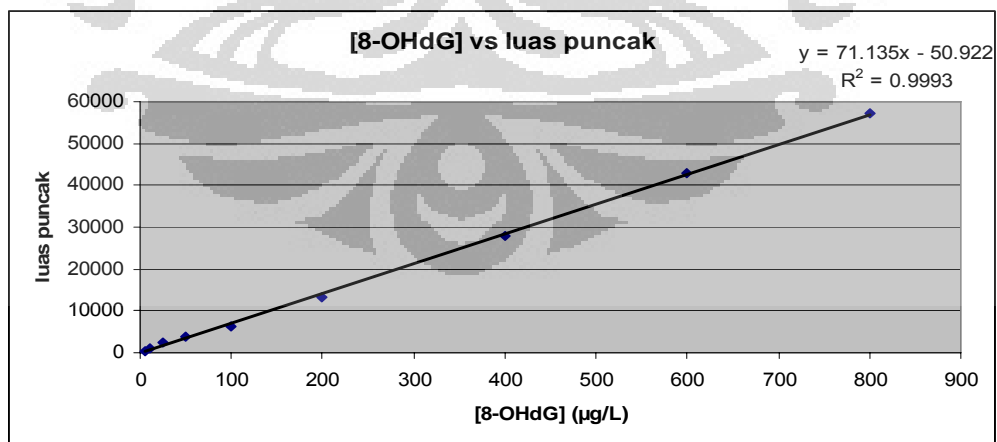


**Gambar 4.8** Kromatogram sampel urin yang ditambahkan standar 8-OHdG dengan konsentrasi 10 mg/L dengan perbandingan volume sampel urin yang telah diberi perlakuan : volume standar 8-OHdG 10 mg/L = 1:1.

#### 4.1.2.2 Kurva Kalibrasi

Kurva kalibrasi 8-OHdG untuk konsentrasi 0-800 µg/L:

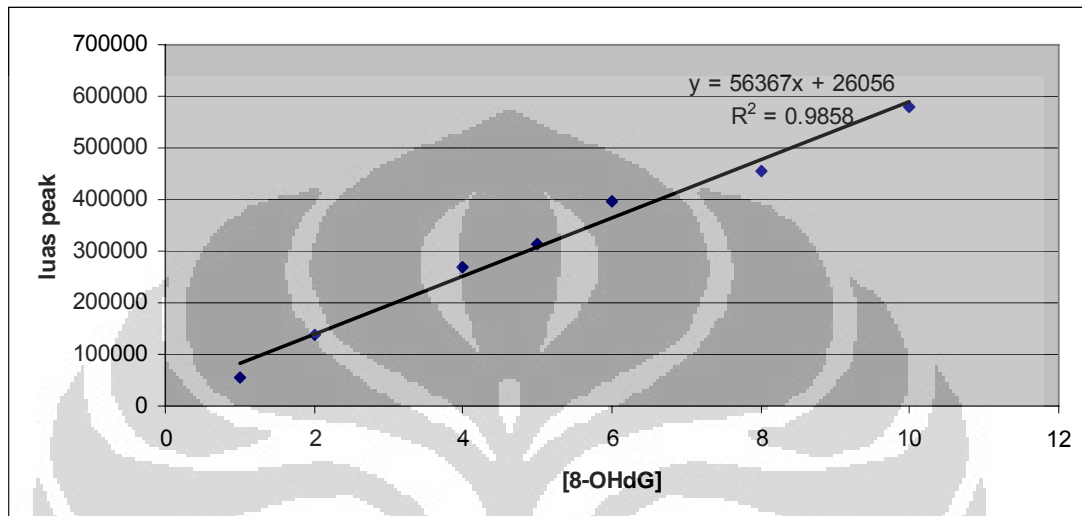
$$y = 71,135 x - 50,922 \text{ dengan } r^2 = 0,9993.$$



**Gambar 4.9** Gambar kurva kalibrasi standar 8-OHdG dengan cakupan 0-800 µg/L.

Kurva kalibrasi 8-OHdG untuk konsentrasi 1 - 10 mg/L:

$$y = 56.367x + 26.056, r^2 = 0,9858.$$



**Gambar 4.10** Kurva kalibrasi standar 8-OHdG dengan cakupan 1-10 mg/L.

#### 4.1.2.3 Batas Deteksi (LOD) dan Batas Kuantifikasi (LOQ)

Batas deteksi alat dari 8-OHdG pada percobaan adalah 5,74 µg/L.

Batas kuantifikasi alat adalah 19,12 µg/L.

Perhitungan LOD dan LOQ dapat dilihat pada Lampiran 1.

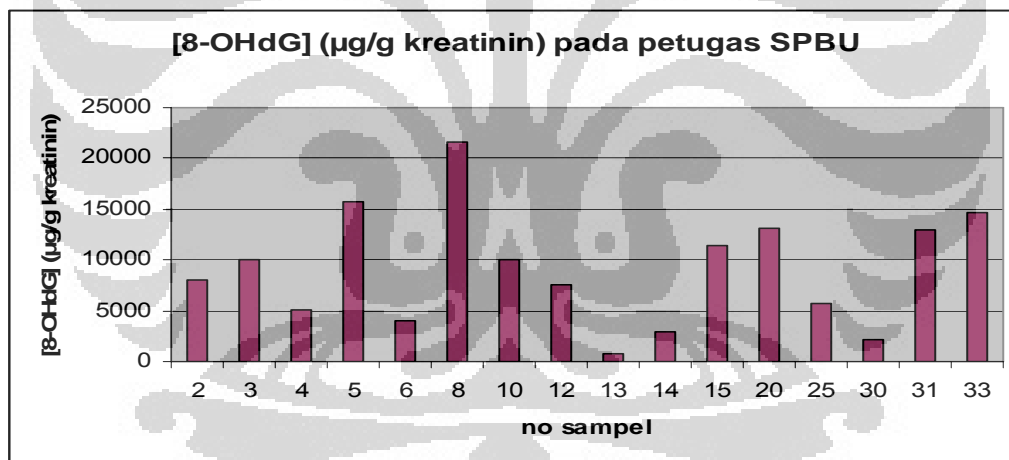
#### 4.1.2.4 Uji Keterulangan

Hasil uji keterulangan pada tiga kadar larutan 8-OHdG yang diuji pada percobaan ini memberikan nilai koefisien variasi di bawah 2,0 %. Data selengkapnya dapat dilihat pada Lampiran 1. Nilai koefisien variasi di bawah

2,0 % menunjukkan bahwa instrumen berada dalam kondisi yang baik serta memiliki presisi yang baik.

#### 4.1.3 HASIL PENGUKURAN 8-OHdG DALAM SAMPEL URIN

Pada penelitian ini, diambil 16 sampel petugas SPBU dan kontrol sebanyak 8 orang yang tidak bekerja di SPBU. Hasil pengukuran dengan HPLC yang ditunjukkan seperti kromatogram pada Gambar 4.7 menunjukkan bahwa 8-OHdG pada urin sampel petugas SPBU dan urin pada kontrol dapat terdeteksi alat. Hal ini menunjukkan adanya ekskresi 8-OHdG dalam urin.

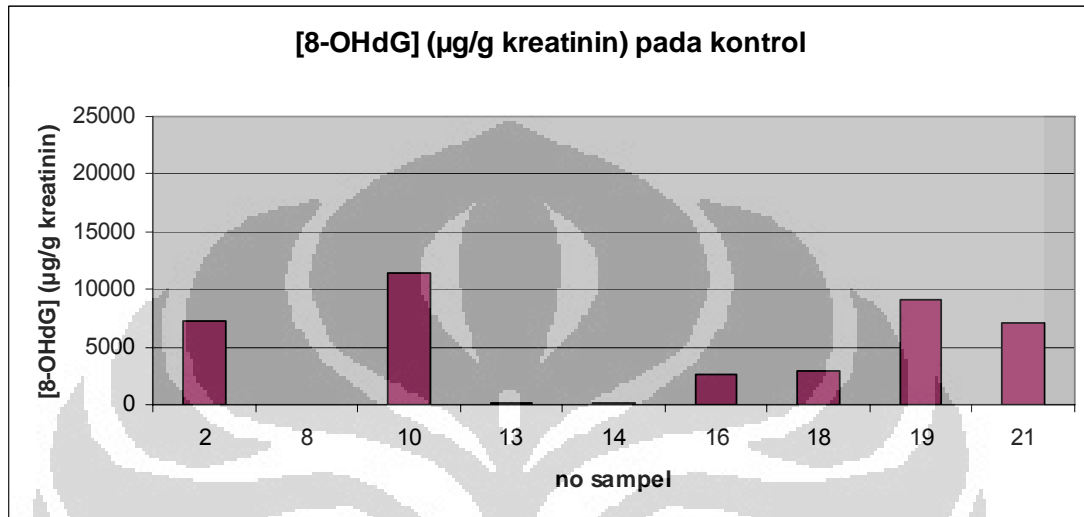


**Gambar 4.11** Diagram batang [8-OHdG] pada sampel petugas SPBU dengan konsentrasi 8-OHdG dalam µg/gram kreatinin

Gambar 4.11 menunjukkan konsentrasi 8-OHdG (µg/g kreatinin) pada sampel petugas SPBU. Range konsentrasi 8-OHdG yang terukur pada kelompok sampel petugas SPBU adalah 701,78-21.571,17 µg/g kreatinin.



Rata-rata konsentrasi 8-OHdG untuk kelompok sampel ini adalah 9.164,70  $\mu\text{g/g}$  kreatinin dengan standar deviasi 5.615,12  $\mu\text{g/g}$  kreatinin.



**Gambar 4.12** Diagram batang konsentrasi 8-OHdG ( $\mu\text{g/g}$  kreatinin) pada kontrol

Gambar 4.12 menunjukkan konsentrasi 8-OHdG pada sampel urin kelompok kontrol. Range konsentrasi 8-OHdG pada sampel urin kontrol adalah 62,73-7.322,57  $\mu\text{g/g}$  kreatinin. Rata-rata konsentrasi 8-OHdG pada sampel urin kelompok ini adalah 3.669,20  $\mu\text{g/g}$  kreatinin dengan standar deviasi 3.662,46  $\mu\text{g/g}$  kreatinin.

## 4.2 PEMBAHASAN

Sebagai *biomarker* stress oksidatif akibat paparan ROS, dapat digunakan *DNA-adduct* dari kerusakan DNA, yaitu 8-hidroksi-7,8-dihidro-2'-deoksiguanosin (disingkat 8-OHdG). Pada penelitian ini, dilakukan analisis 8-OHdG dalam urin yang terbentuk dari paparan ROS yang bersumber dari paparan lingkungan kerja, dalam hal ini paparan lingkungan kerja SPBU di DKI Jakarta yang seperti yang telah dituliskan pada sub bab 3.1.

Menurut literatur yang telah dipaparkan pada tinjauan pustaka, 8-OHdG sebagai biomarker paparan ROS dapat terbentuk dari sumber endogenus dan eksogenus. Pada penelitian ini, paparan yang diamati adalah dari sumber eksogenus, yakni paparan akibat lingkungan kerja, khususnya akibat paparan bahan bakar minyak yang diketahui mengandung berbagai bahan kimia berbahaya, seperti benzena, poliaromatik hidrokarbon dan lainnya.

Terbentuknya 8-OHdG dari paparan ROS eksogenus dapat disebabkan adanya metabolisme bahan-bahan karsinogenik yang terdapat di lingkungan. Paparan ROS eksogenus pada lingkungan SPBU dapat berasal dari paparan uap bensin dan paparan gas buangan kendaraan. Paparan ROS eksogenus dari uap bensin misalnya adalah paparan benzena, sedangkan paparan dari gas buangan kendaraan contohnya adalah paparan benzo[a]pirena.

Gambar 2.2 menggambarkan jalur metabolisme benzena sebagai bahan karsinogenik yang mengalami aktivasi metabolik pada sitokrom P450

sehingga dapat menghasilkan ROS yang selanjutnya ROS ini dapat menyerang DNA sehingga terbentuklah DNA *adduct*, yang salah satunya dapat berupa 8-OHdG dalam urin yang kemudian dapat diukur dengan metode yang digunakan pada penelitian ini. Gambar 2.3 menunjukkan jalur metabolisme benzo[a]pirena sebagai bahan karsinogenik pada gas buangan yang setelah masuk ke dalam tubuh melalui absorpsi, akan mengalami aktivasi metabolik oleh sitokrom P450 menghasilkan produk samping berupa anion superoksida yang kemudian oleh adanya enzim SOD (superoksida dismutase) akan membentuk hidrogen peroksida yang dengan adanya ion  $Fe^{2+}$  mengalami proses redoks membentuk radikal hidroksil yang dapat juga disebut reaksi Fenton.<sup>[7]</sup> Radikal hidroksil ini dapat menyerang DNA, lemak dan protein. Penyerangan radikal hidroksil pada DNA menyebabkan terjadinya kerusakan oksidatif DNA yang selanjutnya akan membentuk 8-OHdG yang akan diekskresikan ke dalam urin melalui mekanisme BER (*Base Excision Repair*). Sedangkan penyerangan radikal hidroksil pada lemak akan menyebabkan peroksidasi lemak yang dapat membentuk radikal peroksida yang kemudian menyerang DNA dan dapat membentuk 8-OHdG yang selanjutnya juga akan diekskresikan melalui urin.

8-OHdG sebagai *biomarker* paparan ROS akibat paparan di lingkungan kerja SPBU ini dapat terdeteksi pada sampel urin. Pengukuran 8-OHdG pada penelitian ini dilakukan dengan alat HPLC-UV. Pengukuran 8-OHdG dapat dilakukan dengan membandingkan waktu retensi antara puncak larutan standar 8-OHdG dengan puncak yang muncul di menit yang sama

pada sampel urin. Untuk meyakinkan adanya 8-OHdG pada sampel, dilakukan penambahan standar internal yang berupa larutan standar 8-OHdG yang ditambahkan pada sampel sebelum pengukuran dengan HPLC. Peningkatan intensitas dan luas salah satu puncak pada menit di saat larutan standar 8-OHdG muncul itulah yang menunjukkan bahwa puncak tersebut adalah puncak 8-OHdG.

Dari hasil pengukuran pada sampel urin, 8-OHdG dapat ditemukan dalam urin petugas SPBU maupun pada kontrol. Hal ini menunjukkan bahwa 8-OHdG sebagai indikator kerusakan DNA akibat oksidatif stress karena paparan ROS dapat dideteksi dengan metode yang digunakan pada penelitian ini.

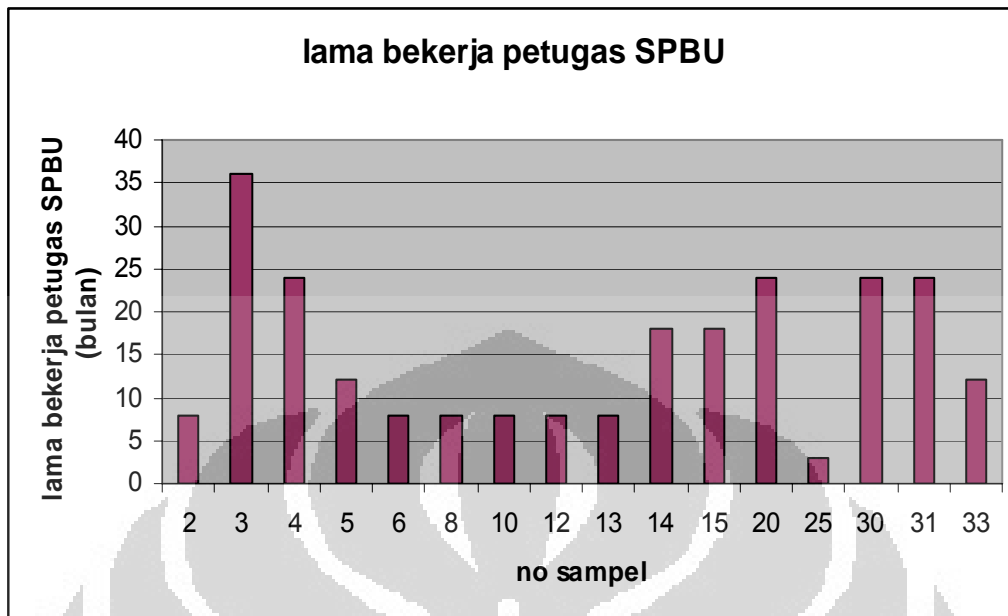
Pada penelitian ini, ditemukan bahwa kadar 8-OHdG dalam urin petugas SPBU berkisar antara 701,78-21.571,17  $\mu\text{g/g}$  kreatinin sedangkan kadar 8-OHdG pada urin kontrol berkisar antara 62,73-7.322,57  $\mu\text{g/g}$  kreatinin. Hasil ini menunjukkan bahwa kadar 8-OHdG dalam urin petugas SPBU lebih tinggi daripada kadar 8-OHdG pada urin kontrol. Dari hasil pengukuran ini dapat disimpulkan terdapat pengaruh bekerja di lingkungan yang terpapar bahan kimia karsinogenik dan volatil seperti pada bensin.

Gambar 4.13 menunjukkan diagram mengenai lama bekerja petugas SPBU. Sedangkan gambar 4.14 menunjukkan lama bekerja petugas SPBU dan kadar 8-OHdG dalam urin. Dari gambar ini, dapat dilihat bahwa kadar 8-OHdG dalam urin petugas SPBU tidak menunjukkan korelasi dengan lama paparan. Lama bekerja pada petugas SPBU tidak berhubungan peningkatan

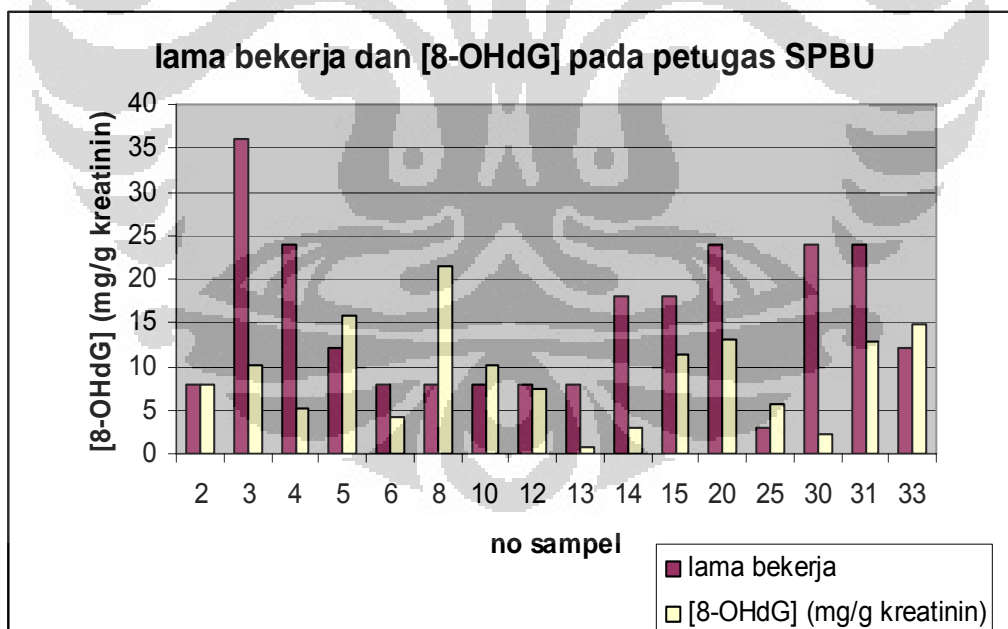
8-OHdG dalam urin. Hal ini dapat dilihat pada nomor sampel 2, 6, 8, 10, 12, dan 13 dari kelompok yang telah bekerja di SPBU selama kurang dari satu tahun. Pada kelompok ini, dapat dilihat bahwa konsentrasi 8-OHdG mereka tidak saling berdekatan. Hal yang sama juga dapat diamati pada nomor sampel 4, 20, 30 dan 31. Dengan lama kerja yang sama, mereka memiliki kadar 8-OHdG dalam urin yang berbeda cukup jauh.

Kadar 8-OHdG yang bervariasi cukup jauh antara individu dalam kelompok kerja yang sama menunjukkan laju absorpsi bahan-bahan karsinogenik yang berbeda untuk setiap individu, paparan di luar paparan kerja seperti paparan asap kendaraan saat melakukan aktivitas transportasi dari tempat tinggal menuju tempat kerja, asupan makanan, serta asupan vitamin dan antioksidan. Hal yang sama juga berlaku pada kontrol. Terdapat beberapa kontrol yang memiliki kadar 8-OHdG yang cukup tinggi. Hal ini dimungkinkan karena jalur transportasi yang digunakan, asupan makanan dan asupan vitamin serta antioksidan.

Jika dilakukan perbandingan antara rata-rata kadar 8-OHdG dalam sampel urin kontrol dengan kadar 8-OHdG dalam sampel urin petugas SPBU, dapat dilihat bahwa kadar 8-OHdG relatif lebih tinggi dari pada kadar 8-OHdG dalam urin kontrol. Hal ini dapat dilihat dengan membandingkan diagram batang pada gambar 4.12 dengan gambar 4.13.



**Gambar 4.13** Diagram batang lama bekerja petugas SPBU



**Gambar 4.14** Diagram batang lama bekerja dan konsentrasi 8-OHdG pada urin petugas SPBU.

Dari perhitungan data statistik (Lampiran 4), dengan menggunakan anova, diperoleh kesimpulan bahwa terdapat perbedaan antara kadar 8-OHdG dalam urin petugas SPBU dengan kontrol. Hasil ini sesuai dengan dugaan awal bahwa kadar 8-OHdG pada petugas SPBU sebagai subjek yang terpapar ROS dari bahan karsinogenik dari lingkungan kerja akan cenderung berbeda dan cenderung lebih tinggi dari pada konsentrasi 8-OHdG pada kontrol sebagai subjek yang tidak terpapar bahan karsinogenik dari lingkungan kerja.

Ekskresi 8-OHdG dalam urin menunjukkan adanya mekanisme perbaikan basa DNA yang rusak, dalam hal ini adalah basa guanin, melalui mekanisme *Base Excision Repair* (disingkat BER). Peningkatan ekskresi 8-OHdG dalam urin diakibatkan karena melimpahnya sumber ROS yang dapat menyerang DNA baik dari lingkungan kerja maupun dari pola hidup yang kurang sehat dan rendahnya mekanisme perbaikan DNA secara alami dalam tubuh manusia karena kurangnya konsumsi antioksidan. Pola makanan yang tidak sehat dapat mengacu pada terjadinya peroksidasi lemak oleh peroksisom sehingga dapat menyebabkan adanya kerusakan DNA seperti yang sudah dijelaskan pada literatur. Sementara pola konsumsi makanan yang banyak mengandung kolesterol juga dapat meningkatkan kadar 8-OHdG karena kolesterol dalam tubuh dimetabolisme oleh sitokrom sehingga menghasilkan produk samping berupa ROS yang kemudian dapat menyerang DNA. Mitokondria juga menyumbangkan ROS pada saat respirasi sel dalam rangka penyediaan energi sel.

Penyerangan ROS terhadap DNA akibat paparan zat karsinogenik dari sumber eksogen maupun endogen dapat mengakibatkan kerusakan DNA. Jika mekanisme perbaikan DNA terhambat atau lebih lambat daripada laju kerusakan DNA, maka mutasi akan terjadi dan akan memicu terjadinya kanker. Menurut Tokujiro Yano<sup>[14]</sup>, ekskresi 8-OHdG dalam urin tidak berhubungan dengan usia atau jenis kelamin, tetapi berkaitan dengan potensi penyakit kanker. Karena itu, semakin tinggi kadar 8-OHdG dalam urin dapat menunjukkan semakin tingginya potensi penyakit kanker.<sup>[5, 14]</sup> Umumnya bahan-bahan sumber ROS seperti logam (misalnya logam  $\text{Co}^{2+}$ ,  $\text{Cu}^{2+}$ , dan arsenit) menghambat mekanisme perbaikan DNA pada tahap setelah pelepasan basa yang teroksidasi oleh AP liase. Namun, terdapat pula beberapa logam seperti  $\text{Ni}^{2+}$  dan  $\text{Cd}^{2+}$  yang mengganggu pengenalan kerusakan basa DNA oleh hOgg1 sehingga hOgg1 tidak mengenali kerusakan DNA dan AP liase tidak memotong basa DNA yang telah rusak tersebut sehingga terjadi kerusakan DNA permanen yang mengacu pada perkembangan kanker.<sup>[18, 19, 20]</sup>

Berdasarkan penelitian di Cina, konsumsi vitamin C dan vitamin E memiliki efek pada ekskresi 8-OHdG pada urin. Konsumsi vitamin C dan vitamin E secara rutin akan menangkap ROS yang ada dalam tubuh sehingga kuantitas ROS dalam tubuh akan berkurang. Kuantitas ROS yang berkurang akan mengurangi kerusakan DNA akibat ROS, sehingga ekskresi 8-OHdG yang merupakan hasil DNA yang teroksidasi akan lebih sedikit dari



pada ekskresi 8-OHdG pada subjek yang tidak mengonsumsi vitamin antioksidan. <sup>[21]</sup>

Pola konsumsi makanan juga memberikan pengaruh pada ekskresi 8-OHdG sebagai *biomarker* kerusakan DNA. Berdasarkan penelitian mengenai efek peningkatan konsumsi sayuran dan buah terhadap *biomarker* kerusakan sel, dalam hal ini, 8-OHdG, konsumsi sayuran dan buah yang banyak mengandung antioksidan akan mengurangi ekskresi 8-OHdG dalam urin karena antioksidan akan menghambat penyerangan ROS terhadap DNA. <sup>[22]</sup>

Jadi, berdasarkan studi deteksi 8-OHdG pada petugas SPBU yang dibandingkan dengan kontrol, kerusakan DNA dapat terjadi akibat paparan ROS di lingkungan kerja. Namun, beberapa data menunjukkan bahwa pada kontrol, ditemukan konsentrasi 8-OHdG sebagai biomarker kerusakan DNA yang tinggi dalam ekskresinya di urin. Hal ini menunjukkan bahwa kerusakan DNA dapat bersumber dari paparan di luar lingkungan kerja, misalnya dapat berasal dari pola konsumsi makanan yang tidak sehat dan rendahnya konsumsi antioksidan sehari-hari.

## **BAB V**

### **KESIMPULAN DAN SARAN**

#### **5.1 Kesimpulan**

- Secara umum, paparan zat karsinogenik pada lingkungan kerja meningkatkan paparan oksidatif stress pada tubuh manusia.
- Paparan oksidatif stress dapat diukur dengan biomarker 8-hidroksi-7,8-dihidro-2'-deoksiguanosin melalui urin pada subjek yang terpapar.
- Pada petugas SPBU, tingkat paparan oksidatif stress yang diukur, yaitu 8-OHdG, relatif lebih tinggi dibandingkan dengan kontrol yang tidak bekerja di SPBU.

#### **5.2 Saran**

- Perlu dilakukan studi lebih mendalam mengenai efek paparan spesies oksigen reaktif pada lingkungan kerja SPBU.
- Pada petugas SPBU perlu diberikan alat pelindung diri seperti masker dan sarung tangan untuk meminimalisir paparan ROS dari bensin.
- Perlu dilakukan pengecekan kesehatan secara rutin pada subjek yang memiliki risiko terpapar bahan kimia berbahaya.
- Konsumsi makanan sehat dan antioksidan perlu diberikan untuk mengurangi kuantitas penyerangan ROS pada DNA.

## DAFTAR PUSTAKA

1. Kasai, H., Kawai, K. dan Li, Y. Analysis of 8-OH-dG and 8-OH-Gua as Biomarkers of Oxidative Stress. *Genes and Environment*. Vol 30, 33-40, 2008.
2. Mizoue, T., Kasai, H., Kubo, T., dan Tokunaga, S. Leanness, Smoking, and Enhanced Oxidative DNA Damage. *Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev.*, 582-585, 2006.
3. Lehninger, Albert L. 1982. *Dasar-Dasar Biokimia Jilid 3*. Jakarta: Erlangga.
4. DNA. <http://www.wikipedia.org/wiki/DNA> (11 februari 2009, pukul 22.15)
5. King, R.J.B. *Cancer Biology Second Edition*. Harlow: Pearson Education Limited. 2000.
6. Guindon, K. *Investigation of The Role of Oxidative DNA Damage in Aflatoxin B<sub>1</sub>-Induced Pulmonary Carcinogenesis*. Departemen Farmakologi dan Toksikologi: Universitas Queen. 2008.
7. Hofer, T. *Method Development for Analysis of 8-oxodG as a Biomarker for Oxidative Stress*. Departemen Biosains: Institut Karolinska. 2001.
8. Singh, R., Sram, R. J., Binkova, B., Kalina, I., Popov, T.A., Georgiva, T., Garte, S., Taioli, E., Farmer, P. B. The Relationship Between Biomarkers of Oxidative DNA Damage, Polycyclic Aromatic Hydrocarbon DNA Adducts, Antioxidant Status and Genetic

Susceptibility following Exposure to Environmental Air Pollution in Humans. *Reviewers Edit.*, 2006.

9. Hiraku, Y. dan Kawanishi, S. Oxidative DNA Damage and Apoptosis Induced by Benzene Metabolites. *Cancer Research*, 56, 5172-5178, 1996.
10. Narayanan, S. dan Appleton, H. D. Creatinine: Review. *Clin. Chem.*, 26, 1119-1126, 1980.
11. Barr, D. B., Wilder, L. C., Caudil, S.P., Gonzales, A.J., Needham, L.L., dan Pirkle, J.L. Urinary Creatinine Concentrations on the U.S. Population: Implications for Urinary Biologic Monitoring Measurements. *Environ. Health Perspect.*, 113, 192-200, 2005.
12. "creatine synthesis" <http://www.med.unibs.it/aminoacidderivatives.html> (19 februari 2009, pukul 10.10)
13. Tudek, B. , Swoboda, M., Kowalczyk, P., Olinski, R. Modulation of Oxidative DNA Damage Repair by The Diet, Inflammation and Neoplastic Transformation. *Journal of Physiology and Pharmacology*, 57, 33-49, 2006.
14. Gackowski, D., Speina, Elzbita, Zelinska, M., Kowalenski, J., Rozalski, R., Siomek, A., Paciorek, T., Tudek, B., Olinski, R., Products of Oxidative DNA Damage and Repair as Possible Biomarkers of Susceptibility to Lung Cancer. *Cancer Research*, 63, 4899-4902, 2003.

15. Yung Yen, M., Kao, S.H., Wang, A.G., dan Wei, Y.H. Increased 8-Hydroxy-2'-Deoxyguanosine in Leukocyte DNA in Leber's Hereditary Optic Neuropathy. *Investigative Ophthalmology & Visual Science*, 45, 1688-1691, 2004.
16. 8-OHdG. <http://www.oxis.com/8-OHdG/pdfs/8-OHdG>. (16 februari 2009, pukul 09.23)
17. 8-OHdG. <http://www.zeptometrix.com/pdfs/8-OHdG.pdf> (13 februari 2009, pukul 22.12)
18. Lynn, S., Lai, H.T., Gurr, J.R., dan Jun, K. Y. Arsenite retards DNA break rejoining by inhibiting DNA ligation. *Mutagenesis*, 12, 353-358, 1997.
19. Hartwig, A., Asmuss, M., Ehleben, I., Herzer, U., Kostelac, D., Pelzer, A., Schwerdtle, T., dan Bürkle, A. Interference by Toxic Metal Ions with DNA Repair Processes and Cell Cycle Control: Molecular Mechanisms. *Environ. Health Perspect.*, 110, 797-799, 2002.
20. Ding, W., Liu, W., Cooper, K.L., Qin, X., Bergo, P.L., Hudson, L.G., dan Liu, K.J. Inhibition of PARP-1 by Arsenite Interferes with Repair of Oxidative DNA Damage. *Journals of Biological Chemistry*, 1-25, 2008.
21. Huang, H. Y., Helzlsouer, K.J. dan Appel, L.J. The Effects of Vitamin C and Vitamin E on Oxidative DNA Damage: Results from A

- Randomized Controlled Trial. *Cancer Epidemiology, Biomarkers, & Prevention*, 9, 647-652, 2000.
22. Thompson, H. J., Heimendinger, J., Haegele, A., Sedlacek, S.M., Gillette, C., O'Neil, C., Wolfe, P., dan Conry, C. Effect of Increased Vegetable and Fruit Consumption on Markers of Oxidative Cellular Damage. *Carcinogenesis*, 20, 2261-2266, 1999.
23. World Health Organization. *Biological Monitoring of Chemical Exposure in the Workplace Guideline Vol 1*. Geneva. 1996
24. Rosa, L.C. *Mechanism of Oxidative Stress-Induced Cell Death in Hepatocytes: Targets for Protective Intervention*. Departemen Gastroenterologi dan Hepatologi: Universitas Groningen. 2006.
25. Cooke, Marcus S., Olinski, R. dan Loft, S. *Measurement and Meaning of Oxidatively-modified DNA Lesions in Urine*.
26. Forlenza, Michael J. Increased Serum Levels of 8-Hydroxy-2'-Deoxyguanosine in Clinical Depression. *J. Psychosomatic Medicine*. 68:1-7. 2006.

## LAMPIRAN 1: DATA KONDISI ANALISIS 8-OHdG

### A. KONDISI OPTIMUM ANALISIS 8-OHdG

#### Kondisi Pengukuran

Instrumentasi : Kromatografi Cair Kinerja Tinggi (HPLC),  
Shimadzu LC-20AB

Kolom : LichroCART®(MERCK) RP-18, 5 µm, 4,6  
×250 mm

Detektor : UV-Vis, Shimadzu SPD-20A

Panjang gelombang : 254 nm

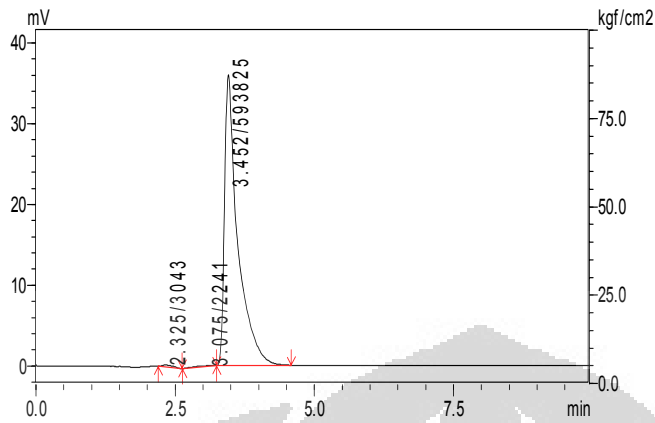
Fasa gerak : Metanol: Buffer fosfat pH 6,7  
10 mmol/liter

Laju alir : 1 mL/menit

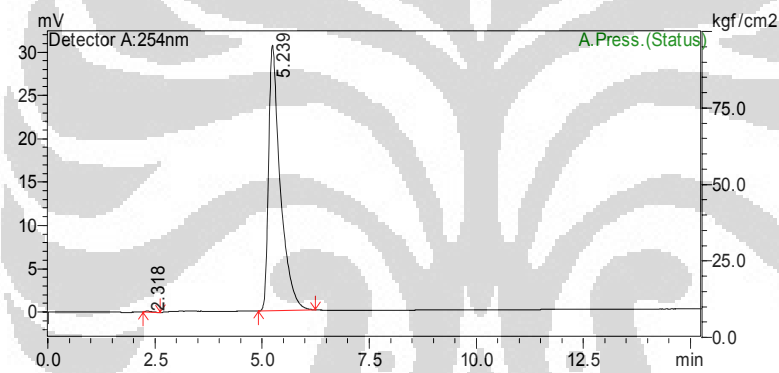
Volume injeksi : 20 µL

Komposisi fasa gerak yang dipilih : Metanol – Buffer fosfat pH 6,7 (10:90)

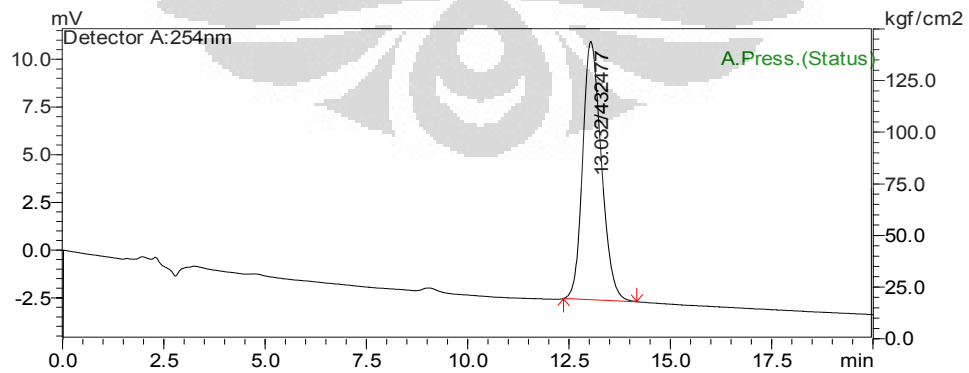
Komposisi fasa gerak Metanol-Buffer	Waktu retensi (T <sub>r</sub> )
30:70	3,4
20:80	5,2
10:90	13,9
5:95	29,265



Gambar : Kromatogram 8-OHdG pada komposisi eluen MeOH- buffer (30:70)

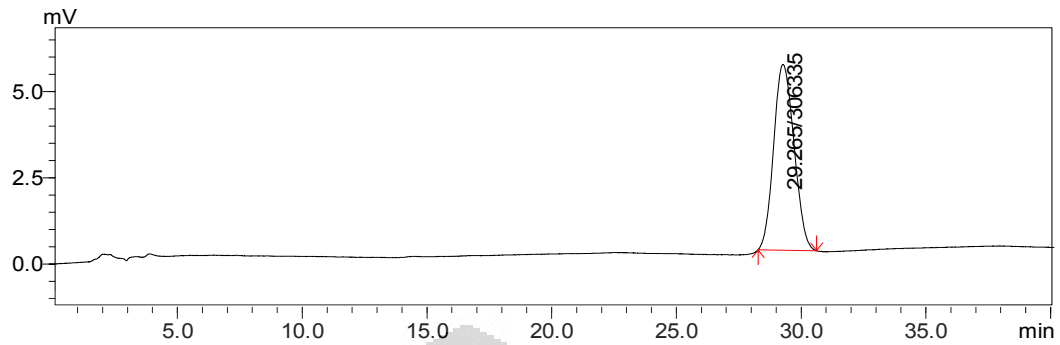


Gambar : Kromatogram 8-OHdG pada komposisi eluen MeOH- buffer (20:80)



Gambar : Kromatogram 8-OHdG pada komposisi eluen MeOH- buffer (10:90)



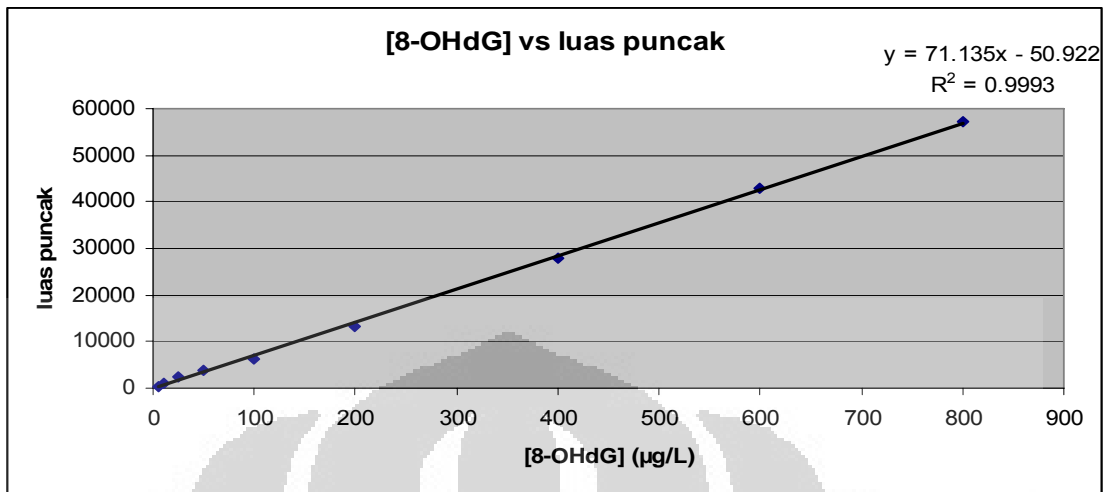


Gambar : Kromatogram 8-OHdG pada komposisi eluen MeOH- buffer (5:95)

## B. PENENTUAN BATAS DETEKSI (LOD) DAN BATAS KUANTIFIKASI (LOQ)

Persamaan kurva kalibrasi :  $y = 71,135x - 50,922$

Konsentrasi ( $\mu\text{g/L}$ )	Luas puncak (y)	Luas puncak (y')	Selisih (y-y')	$(y-y')^2$
1	134	20,213	113,787	12.947,48
2	157	91,348	65,652	4.310,185
3	223	162,483	60,517	3.662,307
4	250	233,618	16,382	268,3699
5	490	304,753	185,247	34.316,45
			$\Sigma$	55.504,79



$$y' = b \cdot \text{conc} + c ; b = 71,135 ; c = -50,922$$

$$S_y = \sqrt{\frac{\sum (y - y')^2}{n - 2}}$$

$$\text{LOD} = (3 \cdot S_y) / b = 5,7364$$

$$\text{LOQ} = (10 \cdot S_y) / b = 19,1215$$

### C. PRESISI

$$\%KV < 2\%$$

1 ppm				
y	y'	y-y'	(y-y') <sup>2</sup>	% KV
55.125	55.799,66667	-674,66667	455.175,116	0,934394
56.614	55.799,66667	814,333333	663.138,778	
55.347	55.799,66667	-452,66667	204.907,114	
55.948	55.799,66667	148,33333	22.002,7768	

55.897	55.799,66667	97,33333	9.473,77713	
55.867	55.799,66667	67,33333	4.533,77733	
5 ppm				
Y	y'	y-y'	$(y-y')^2$	% KV
316.223	316.866,83333	-643,83333	414.521,357	1,245591
320.439	316.866,83333	3.572,16667	1.276.0374,7	
319.361	316.866,83333	2.494,16667	6.220.867,38	
310.053	316.866,83333	-6.813,83333	46.428.324,6	
319.918	316.866,83333	3.051,16667	9.309.618,05	
315.207	316.866,83333	-1.659,83333	2.755.046,68	
10 ppm				
Y	y'	y-y'	$(y-y')^2$	% KV
562.890	563.088,3333	-198,33333	39.336,1098	1,271887
567.179	563.088,3333	4.090,66667	16.733.553,8	
569.444	563.088,3333	6.355,66667	40.394.498,8	
568.270	563.088,3333	5.181,66667	26.849.669,5	
560.541	563.088,3333	-2.547,3333	6.488.907,09	
550.206	563.088,3333	-12.882,333	165.954.512	

## LAMPIRAN 2: DATA KONSENTRASI KREATININ DALAM SAMPEL

Data kreatinin sampel SPBU

No sampel	[kreatinin] (gram/Liter)
2	1,1636
3	0,4512
4	0,3687
5	2,6288
6	0,3745
8	0,1840
10	2,5723
12	0,4076
13	1,4700
14	2,1302
15	0,9017
20	1,2595
25	1,1135
30	0,9901
31	0,7639
33	1,1446

Data kreatinin sampel kontrol

No sampel	[kreatinin] (gram/Liter)
2	0,8393
8	3,2083
13	3,1420
14	0,4013
16	2,3041
18	2,8278
19	2,3621
21	1,0463

Data sampel SPBU nomor 11, 22, 24 dan 27 tidak disertakan

Data sampel kontrol nomor 10 tidak disertakan

### LAMPIRAN 3: DATA KUANTIFIKASI 8-OHdG DALAM SAMPEL

Data [8-OHdG] dalam sampel

petugas SPBU

No sampel	[8-OHdG] ( $\mu\text{g/L}$ )
2	9.320,4180
3	4.532,9359
4	1.901,8220
5	41.579,2574
6	1.526,5315
8	3.969,0954
10	25.819,3624
12	3.054,9435
13	1.031,6157
14	6.156,0133
15	10.302,1626
20	16.587,5069
25	6.409,6368

30	2.199,8332
31	9.887,3454
33	16.839,7467

Data konsentrasi 8-OHdG pada sampel kontrol

No sampel	[8-OHdG] ( $\mu\text{g/L}$ )
2	6.145,8300
8	201,2509
13	335,8120
14	55,1344
16	6.038,7461
18	8.346,5858
19	21.394,6103
21	7.422,6409

Data sampel SPBU nomor 11, 22, 24 dan 27 tidak disertakan

Data sampel kontrol nomor 10 tidak disertakan

Data Konsentrasi 8-OHdG dalam kreatinin

Data sampel SPBU

Data sampel Kontrol

No sampel	[8-OHdG] ( $\mu\text{g/g}$ kreatinin)	No sampel	[8-OHdG] ( $\mu\text{g/g}$ kreatinin)
2	8.009,9845	2	7.322,5664
3	10.046,4006	8	62,7282
4	5.158,1828	13	106,8784
5	15.816,8204	14	137,3894
6	4.076,1855	16	2.620,8698
8	21.571,1706	18	2.951,6181
10	10.037,4616	19	9.057,4533
12	7.494,9546	21	7.094,1804
13	701,7794		
14	2.889,8757		
15	11.425,2663		
20	13.169,9142		
25	5.756,2971		
30	2.221,8293		
31	12.943,2458		
33	14.712,3420		

Data sampel SPBU nomor 11, 22, 24 dan 27 tidak disertakan

Data sampel kontrol nomor 10 tidak disertakan

## LAMPIRAN 4: PERHITUNGAN STATISTIK

### A. Rerata konsentrasi 8-OHdG dalam sampel

#### Descriptives

	N	Mean	Std. Deviation	Std. Error	95% Confidence Interval for Mean		Minimum	Maximum
					Lower Bound	Upper Bound		
spbu	16	9,1647E3	5,615,11496	1,40378E3	6.172,6345	12.156,8016	1.305,56	21.571,17
kontrol	8	3,6692E3	3,662,45877	1,29487E3	607,3183	6.731,1027	62,73	9.057,45
Total	24	7,3329E3	5,625,67041	1,14834E3	4.957,3699	9.708,3945	62,73	21.571,17

### B. Uji homogenitas variansi

#### Test of Homogeneity of Variances

kadar8OHdG

Levene Statistic	df1	df2	Sig.
1,529	1	22	0,229

### C. Uji perbedaan konsentrasi 8-OHdG antara sampel petugas SPBU dan sampel kontrol

$H_0$  = tidak ada perbedaan konsentrasi 8-OHdG pada sampel urin SPBU dan kontrol

$H_1$  = ada perbedaan konsentrasi 8-OHdG pada sampel urin SPBU dan kontrol

### ANOVA

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	1,611E8	1	1,611E8	6,251	0,020
Within Groups	5,668E8	22	2,577E7		
Total	7,279E8	23			

$\alpha < 0,05$

$\alpha = 0,02$ , karena  $\alpha < 0,05$ , maka  $H_0$  ditolak

$H_0$  ditolak, maka ada perbedaan konsentrasi 8-OHdG pada sampel urin petugas SPBU dan sampel urin kontrol.

Data sampel SPBU nomor 11, 22, 24 dan 27 tidak disertakan

Data sampel kontrol nomor 10 tidak disertakan



## LAMPIRAN 5: INFORMED CONSENT

### INFORMED CONSENT

PENJELASAN MENGENAI PENELITIAN  
DETEKSI BIOMARKER 8-HIDROKSI DEOKSIGUANOSIN PADA  
PETUGAS SPBU DI DKI JAKARTA  
DAN FORMULIR PERSETUJUAN SETELAH PENJELASAN  
(INFORMED CONSENT)

Kami meminta Anda untuk turut mengambil bagian dalam suatu penelitian yang berjudul "*Deteksi Biomarker 8-Hidroksi Deoksiganosin pada Petugas SPBU di DKI Jakarta*" karena kami melihat adanya kemungkinan risiko kanker yang disebabkan oleh paparan bahan kimia yang terdapat di lingkungan dan diduga menyebabkan timbulnya kanker.

Penelitian ini akan dilakukan oleh Ratih Ariyani, mahasiswi Sarjana Ilmu Kimia, Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Universitas Indonesia, untuk mengetahui adanya kerusakan DNA oleh zat yang bersifat penyebab kanker (karsinogen) melalui isolasi dan analisa DNA yang rusak dari urin orang yang berisiko terpapar stress oksidatif.

#### Manfaat Penelitian

Hasil penelitian ini diharapkan dapat memberi informasi ilmiah terkait senyawa kimia yang terdapat di lingkungan sebagai salah satu penyebab kanker. Partisipasi Anda dalam penelitian ini akan memberi sumbangsih besar bagi perkembangan ilmu pengetahuan khususnya

dalam mendeteksi secara dini risiko kanker akibat karsinogen di lingkungan. Partisipasi Anda dalam penelitian ini tidak akan menyebabkan beban keuangan bagi Anda atau keluarga Anda.

#### Pengambilan urin

Urin Anda akan kami minta sebanyak 50 mL untuk keperluan penelitian kami. Urin ini akan kami periksa untuk mengetahui adanya kerusakan DNA yang terjadi sebagai penanda biologik (biomarker) terhadap risiko kanker.

#### Kerahasiaan

Semua data penelitian ini akan diperlakukan secara rahasia sehingga tidak mungkin orang lain menghubungkannya dengan Anda. Anda diberi kesempatan untuk menanyakan semua hal yang belum jelas sehubungan dengan penelitian ini. Anda dapat menghubungi Dr. rer. nat. Budiawan melalui telepon (021) 772-11984 atau melalui surat dengan alamat Departemen Kimia, Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Universitas Indonesia, Depok 16424. Surat persetujuan ini akhirnya akan disimpan di sini.

#### Partisipasi Sukarela

Bila Anda bersedia berpartisipasi, peneliti akan menanyakan beberapa pertanyaan yang berkaitan dengan riwayat pekerjaan, riwayat penyakit dan kebiasaan hidup Anda sehari-hari yang memiliki risiko untuk terjadinya paparan oksidatif stress antara lain paparan melalui lingkungan kerja.

Anda tidak dapat dan tidak akan dipaksa untuk ikut serta dalam penelitian ini bila Anda tidak menghendakinya. Anda hanya boleh ikut mengambil bagian atas kehendak Anda sendiri. Anda berhak untuk menolak ikut serta dalam penelitian ini tanpa perlu memberikan suatu alasan. Bila Anda memutuskan untuk tidak berpartisipasi, tak seorang pun boleh melakukan diskriminasi apapun terhadap Anda.

#### Tanda Tangan

Saya telah membaca, atau dibacakan kepada saya apa yang tertera di atas ini, dan saya telah diberi kesempatan untuk mengajukan pertanyaan-pertanyaan dan membicarakan kegiatan penelitian ini dengan para anggota tim penelitian. Saya memahami maksud, risiko, lamanya waktu dan prosedur penelitian ini. Dengan membubuhkan tanda tangan saya di bawah ini, saya menegaskan keikutsertaan saya secara sukarela dalam kegiatan penelitian ini. Saya telah menerima tembusan dari surat persetujuan ini.

-----  
Tanda tangan dan nama peserta sukarela/wali

-----  
Tanggal

-----  
Tanda tangan dan nama saksi

-----  
Tanggal

-----  
Tanda tangan dan nama peneliti

-----  
Tanggal

## LAMPIRAN 6: KUESIONER

Alamat SPBU:.....

No

sampel:.....

Tanggal pengambilan sampel:.....

Spesimen yang diambil: **urin**

Waktu pengambilan sample: jam.....

### DATA RESPONDEN

Nama Responden:.....

Jenis kelamin: **Perempuan**

Usia:.....tahun

Lokasi Tinggal:.....

Telepon:.....

Tanggal Wawancara:.....

Lama wawancara: jam..... sampai dengan jam.....

### RIWAYAT RESPONDEN

Lokasi bertugas: Jakarta .....

Lama Bertugas:

- a. < 1 tahun
- b. 1-3 tahun
- c. 3-5 tahun
- d. >5 tahun

Frekuensi Kerja: .....hari per minggu

Waktu kerja: .....jam per hari

Safety: A. Masker

a. selalu                      b. kadang-kadang                      c. tidak pernah

B. Sarung Tangan

a. selalu                      b. kadang-kadang                      c. tidak pernah

1. apakah anda merokok?

a. sering                      b. kadang-kadang                      c. tidak pernah

2. apakah anda perokok pasif?

a. YA                              b. TIDAK

3. apakah anda mengkonsumsi minuman beralkohol?

a. sering                      b. kadang-kadang                      c. tidak pernah

4. apakah anda mengkonsumsi obat-obatan?

a. sering                      b. kadang-kadang                      c. tidak pernah

5. apakah anda mengkonsumsi minuman ringan (bersoda)?

a. sering                      b. kadang-kadang                      c. tidak pernah

#### STATUS KESEHATAN

1. Apakah anda mengalami gangguan pernafasan (batuk, radang paru-paru, sesak nafas, asma)?

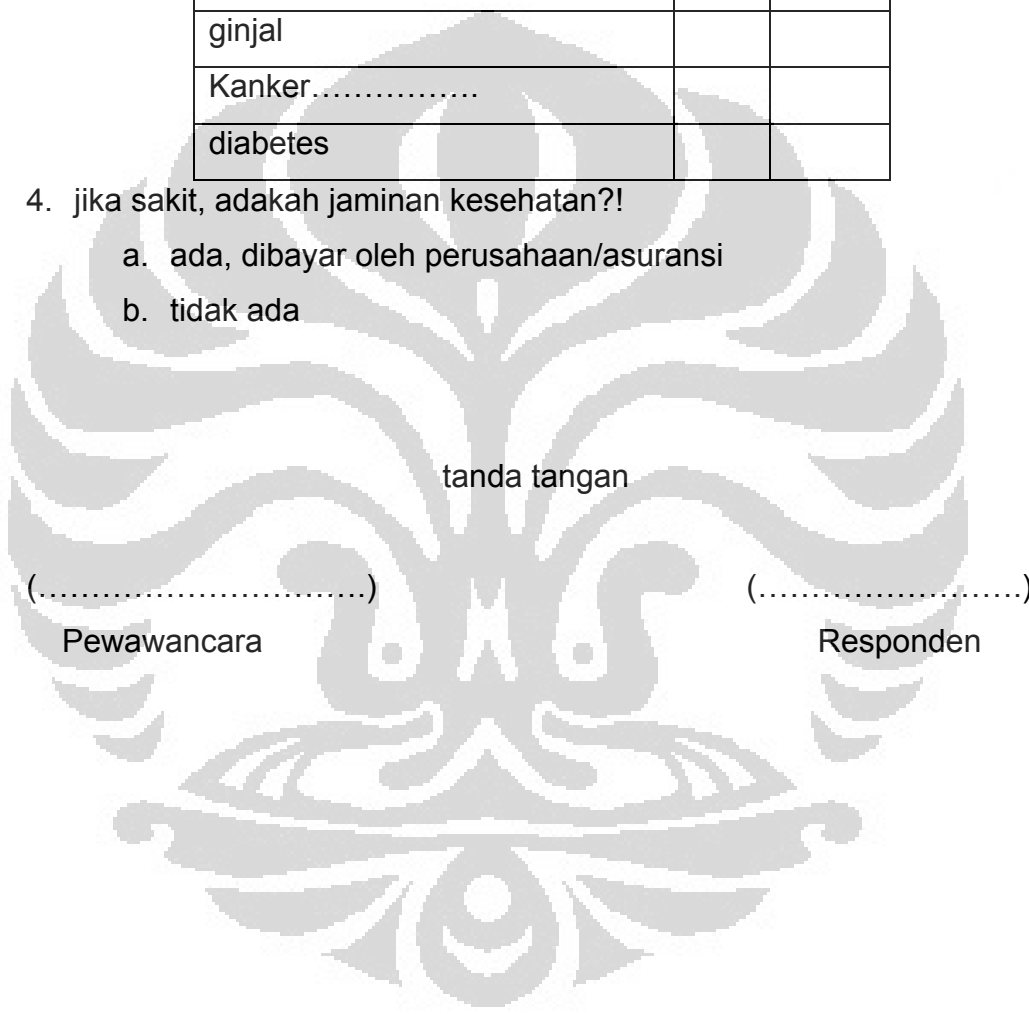
a. sering                      b. kadang-kadang                      c. tidak pernah

jika YA sebutkan:.....

2. apakah anda pernah mengalami pusing atau mual selama bekerja?  
 a. sering                      b. kadang-kadang                      c. tidak pernah
3. apakah anda sedang atau pernah mengalami salah satu dari penyakit di bawah ini?

penyakit	ya	tidak
ginjal		
Kanker.....		
diabetes		

4. jika sakit, adakah jaminan kesehatan?!
- a. ada, dibayar oleh perusahaan/asuransi  
 b. tidak ada



tanda tangan

(.....)

Pewawancara

(.....)

Responden

No kontrol:.....

Tanggal pengambilan sampel:.....

Spesimen yang diambil: **urin**

Waktu pengambilan sampel: jam.....

#### DATA RESPONDEN

Nama Responden:.....

Jenis kelamin: **Perempuan**

Usia:.....tahun

Lokasi Tinggal:.....

Telepon:.....

Tanggal Wawancara:.....

Lama wawancara: jam..... sampai dengan jam.....

1. apakah anda merokok?  
a. sering                      b. kadang-kadang                      c. tidak pernah
2. apakah anda perokok pasif?  
a. YA                              b. TIDAK
3. apakah anda mengkonsumsi minuman beralkohol?  
a. sering                      b. kadang-kadang                      c. tidak pernah
4. apakah anda mengkonsumsi obat-obatan?  
a. sering                      b. kadang-kadang                      c. tidak pernah
5. apakah anda mengkonsumsi minuman ringan?  
a. sering                      b. kadang-kadang                      c. tidak pernah

## STATUS KESEHATAN

1. Apakah anda mengalami gangguan pernafasan (batuk, radang paru-paru, sesak nafas, asma)?

- a. sering                      b. kadang-kadang                      c. tidak pernah

jika YA sebutkan:.....

2. apakah anda pernah mengalami muntah, pusing, atau mual?

- a. sering                      b. kadang-kadang                      c. tidak pernah

3. apakah anda sedang atau pernah mengalami salah satu dari penyakit di bawah ini?

penyakit	ya	tidak
ginjal		
Kanker.....		
diabetes		

tanda tangan

(.....)

Pewawancara

(.....)

Responden