



UNIVERSITAS INDONESIA

**STUDI DETEKSI SENYAWA 8-HIDROKSI-2'-
DEOKSIGUANOSIN (8-OHdG) SEBAGAI BIOMARKER
GENOTOKSISITAS**

SKRIPSI

**VINA YUSRIKA UTAMI
NPM 0806326992**

**FAKULTAS MATEMATIKA DAN ILMU PENGETAHUAN ALAM
DEPARTEMEN KIMIA
DEPOK
JULI 2012**



UNIVERSITAS INDONESIA

**STUDI DETEKSI SENYAWA 8-HIDROKSI-2'-
DEOKSIGUANOSIN (8-OHdG) SEBAGAI BIOMARKER
GENOTOKSISITAS**

SKRIPSI

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

**VINA YUSRIKA UTAMI
NPM 0806326992**

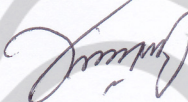
**FAKULTAS MATEMATIKA DAN ILMU PENGETAHUAN ALAM
DEPARTEMEN KIMIA
DEPOK
JULI 2012**

HALAMAN PERNYATAAN ORISINALITAS

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

Nama : Vina Yusrika Utami

NPM : 0806326992

Tanda tangan : 

Tanggal : 9 Juli 2012

HALAMAN PENGESAHAN

Skripsi ini diajukan oleh:

Nama : Vina Yusrika Utami
NPM : 0806326992
Program Studi : Kimia
Judul : Studi Deteksi Senyawa 8-Hidroksi-2'-Deoksiganosin
(8-OHdG) Sebagai Biomarker Genotoksisitas

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

DEWAN PENGUJI

Pembimbing : Dr. rer. nat. Budiawan (.....)
Penguji I : Dra. Susilowati. Hs, M.Sc (.....)
Penguji II : Dr. Antonius Herry Cahyana (.....)
Penguji III : Dr. Asep Saefumillah (.....)

Ditetapkan di : Departemen Kimia Universitas Indonesia

Tanggal : 9 Juli 2012

KATA PENGANTAR

Puji syukur tak terhingga penulis panjatkan kepada Allah SWT yang telah meridhoi penelitian dan penulisan skripsi yang berjudul “Studi Deteksi Senyawa 8-Hidroksi-2’-Deoksiguanosin (8-OHdG) Sebagai Biomarker Genotoksisitas” sehingga dapat diselesaikan tepat pada waktunya. Penulisan skripsi ini dilakukan dalam rangka memenuhi salah satu syarat untuk mencapai gelar Sarjana Sains Jurusan Kimia pada Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Universitas Indonesia.

Selama masa perkuliahan hingga penyusunan skripsi ini, penulis sangat banyak mendapatkan saran, dukungan, dan bimbingan dari berbagai pihak. Oleh karena itu, penulis mengucapkan terima kasih yang sebesar-besarnya kepada :

1. Dr. rer. nat. Budiawan selaku pembimbing penelitian yang telah memberikan banyak arahan, bimbingan, dan motivasi dalam pelaksanaan penelitian dan penulisan skripsi ini.
2. Dr. Ridla Bakri selaku ketua Departemen Kimia FMIPA UI.
3. Dra. Tresye Utari, M.Si selaku koordinator penelitian yang telah memberikan kesempatan dan bantuan dalam penelitian.
4. Seluruh dosen yang telah mengajarkan ilmu-ilmu yang sangat bermanfaat bagi penulis.
5. Mbak Neera Khairani yang telah banyak membantu penulis selama penelitian dan menjadi tempat diskusi serta memberikan dorongan semangat.
6. Dr. Jarnuzi Gunlazuardi selaku pembimbing akademis penulis.
7. Segenap staf laboratorium, administrasi, dan afiliasi di Departemen Kimia FMIPA UI yang memberikan bantuan dalam kelancaran studi ini.
8. Kepala Klinik Onkologi di Bandung Jawa Barat yang telah memberikan izin untuk pengambilan sampel urin penderita kanker payudara.
9. Segenap dokter dan suster di Klinik Onkologi di Bandung yang telah membantu dalam pengambilan dan penyimpanan sampel urin penderita kanker payudara.

10. Seluruh sampel penderita kanker payudara, sampel perokok, dan sampel kontrol yang telah bersedia menjadi sukarelawan dalam penelitian ini.
11. Teman-teman kimia UI 2008 yang telah membantu dan memberikan semangat pada penulis.
12. Rasti Yunita dan Mika Rinawati, sahabat yang selalu bersedia mendengarkan keluh kesah penulis dan memberikan bantuan, masukan serta motivasi.
13. Budi Setiawan, teman dan saudara yang sangat membantu dalam pengumpulan sampel urin.
14. Rekan-rekan penelitian di laboratorium lantai 3 dan lantai 4 yang senasib sepenanggungan dengan penulis : Inna, Nia, Putri, Desti, Reza, Hadi, dan yang lainnya.
15. Teman-teman Griya Aisha : Nicky, Karin, Sonya, dan teman-teman lain yang telah memberikan *support* moral dan bantuan teknis dalam pengumpulan sampel dan penyusunan skripsi penulis.
16. Irsyad, seseorang yang secara langsung dan tidak langsung menambah motivasi penulis untuk belajar menjadi lebih baik dan bisa lulus tepat waktu serta selalu bersedia menjadi tempat luapan emosi penulis.
17. Dan yang paling penting ialah ayahanda Enrijaf, ibunda Yusmiati, Rian dan Venti, serta keluarga lain di kampung halaman yang selalu memberikan dukungan, baik moril maupun materil, serta doa yang tidak terputus.
18. Pihak-pihak lain yang membantu kelancaran penelitian dan penyusunan skripsi ini dan tidak bisa disebutkan satu per satu.

Akhir kata, penulis berharap Allah SWT berkenan membalas segala kebaikan semua pihak yang telah membantu. Semoga skripsi ini dapat memberikan manfaat bagi perkembangan ilmu pengetahuan.

Depok, Juli 2012

Penulis

**HALAMAN PERNYATAAN PERSETUJUAN PUBLIKASI
TUGAS AKHIR UNTUK KEPENTINGAN AKADEMIS**

Sebagai sivitas akademika Universitas Indonesia, saya yang bertanda tangan dibawah ini:

Nama : Vina Yusrika Utami
NPM : 0806326992
Program Studi : Kimia
Departemen : Kimia
Fakultas : Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam
Jenis Karya : Skripsi

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:

Studi Deteksi Senyawa 8-Hidroksi-2'-Deoksiganosin (8-OHdG) Sebagai Biomarker Genotoksisitas

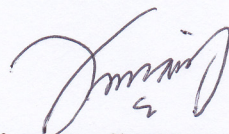
beserta perangkat yang ada (jika diperlukan). Dengan Hak Bebas Royalti Noneksklusif ini Universitas Indonesia bebas menyimpan, mengalihmedia/formatkan, mengelola dalam bentuk pangkalan data (*database*), merawat, dan mempublikasikan tugas akhir saya selama tetap mencantumkan nama saya sebagai penulis/pencipta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

Demikian pernyataan ini saya buat dengan sebenarnya.

Dibuat di : Depok

Pada tanggal : 9 Juli 2012

Yang Menyatakan



(Vina Yusrika Utami)

ABSTRAK

Nama : Vina Yusrika Utami
Program Studi : Kimia
Judul : Studi Deteksi Senyawa 8-Hidroksi-2'-Deoksiguanosin (8-OHdG) Sebagai Biomarker Genotoksisitas

Kanker merupakan penyakit yang dapat menyerang berbagai organ tubuh sehingga berisiko mematikan. Kurangnya informasi dan metode untuk mendeteksi risiko kanker secara dini menjadi salah satu penyebab meningkatnya angka kejadian dan kematian akibat kanker di dunia. Oleh karena itu, berbagai metode sedang dikembangkan untuk mendeteksi risiko kanker secara dini, salah satunya dengan identifikasi biomarker kerusakan DNA berupa DNA *adduct*. Pada penelitian ini dianalisis 8-OHdG, yaitu *adduct* dari basa guanin yang mengalami serangan spesies reaktif pada posisi C-8. Analisis kuantitatif konsentrasi 8-OHdG dalam sampel dilakukan menggunakan instrumen HPLC-UV pada panjang gelombang 254 nm dengan komposisi eluen metanol : buffer fosfat 20:80. Sembilan orang penderita kanker payudara (CA) dan 17 orang perokok (SP) dipilih sebagai sampel pada penelitian ini. Sebagai kontrol, diambil 31 sampel non perokok (NK). Pada sampel kelompok CA, SP, dan NK terdeteksi 8-OHdG masing-masing sebesar 0,913 – 124,171 mg 8-OHdG/g kreatinin, 4,121 – 66,731 mg 8-OHdG/g kreatinin, dan 0,035 - 47,493 mg 8-OHdG/g kreatinin. Hasil analisis dan uji statistik menunjukkan bahwa sampel penderita kanker payudara memiliki konsentrasi 8-OHdG yang lebih tinggi daripada sampel perokok dan sampel kontrol. Konsentrasi 8-OHdG dapat menggambarkan tingkat kerusakan oksidatif DNA.

Kata kunci : Spesies reaktif, Kerusakan DNA, genotoksisitas, DNA *adduct*, 8-OHdG

xiv + 84 halaman : 27 gambar ; 3 tabel

Daftar Pustaka : 43 (1992-2012)

ABSTRACT

Name : Vina Yusrika Utami
Study Program : Chemistry
Title : Study of Detection of 8-Hydroxy-2'-Deoxyguanosine (8-OHdG) as Biomarker of Genotoxicity

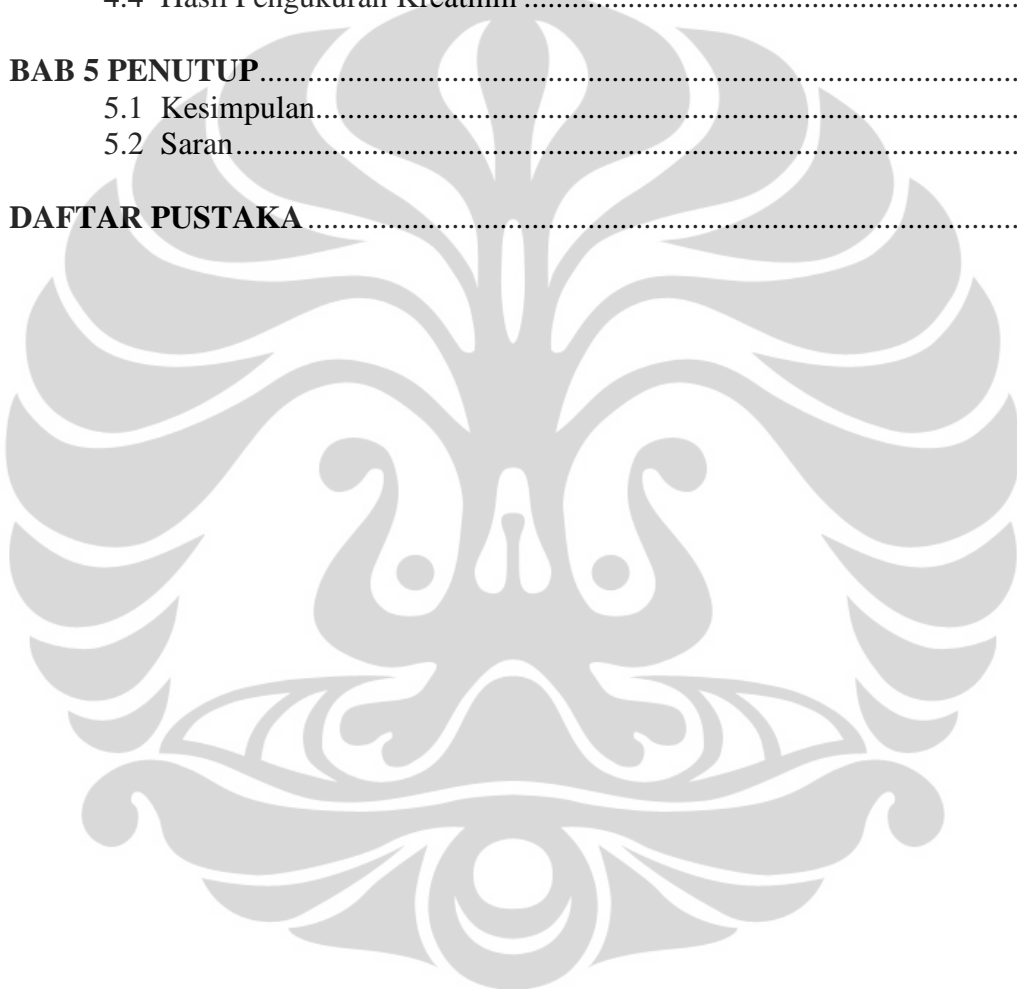
Cancer is a disease that can affect various organs of the body so that it may cause the risk of lethal. Lack of information and methods for early detection of cancer risk is one cause of increasing incidence of and mortality from cancer in the world. Therefore, various methods are being developed for early detection of cancer risk, one methods is with the identification of biomarkers of DNA damage in the form of DNA adducts. In this study, 8-OHdG was analyzed, which is the guanine base adducts of the reactive species atack at C-8 position. Quantitative analysis of 8-OHdG concentration in the sample was carried out using HPLC-UV instrument at a wavelength of 254 nm with eluen composition of methanol : phosphate buffer 20:80. Nine people with breast cancer (CA) and 17 smokers (SP) was chosen as the sample in this study. As a control, 31 samples of non-smokers was taken. On a sample group of CA, SP, and NK, 8-OHdG were detected respectively by 0,913 – 124,171 mg 8-OHdG/g creatinine, 4,121 – 66,731 mg 8-OHdG/g creatinine, dan 0,035 - 47,493 mg 8-OHdG/g creatinine. Analysis and statistical result indicate that breast cancer samples have higher concentrations of 8-OHdG than the control samples and samples of smokers. 8-OHdG concentrations may reflect the level of oxidative DNA damage.

Key words : Reactive species, DNA damage, genotoxicity, DNA adduct, 8-OHdG
xiv + 84 pages : 27 pictures ; 3 tables
Bibliography : 43 (1992-2012)

DAFTAR ISI

HALAMAN JUDUL.....	i
PERNYATAAN ORISINALITAS	ii
LEMBAR PENGESAHAN	iii
KATA PENGANTAR	iv
LEMBAR PERSETUJUAN PUBLIKASI KARYA ILMIAH	vii
ABSTRAK	vii
DAFTAR ISI.....	ix
DAFTAR GAMBAR	xi
DAFTAR TABEL.....	xii
DAFTAR BAGAN	xiii
DAFTAR LAMPIRAN.....	xiv
BAB 1 PENDAHULUAN	1
1.1 Latar Belakang	1
1.2 Perumusan Masalah.....	2
1.3 Tujuan Penelitian.....	3
1.4 Hipotesis.....	3
BAB 2 TINJAUAN PUSTAKA.....	4
2.1 Asam Deoksiribonukleat (DNA).....	4
2.2 Kerusakan DNA (Genotoksisitas).....	5
2.2.1 Radikal Bebas sebagai Sumber Kerusakan DNA	6
2.2.2 Tipe Kerusakan DNA.....	12
2.2.3 Perbaikan Kerusakan DNA	13
2.3 Kanker	17
2.3.1 Karsinogenesis	20
2.3.2 Rokok	21
2.4 Kanker Payudara	22
2.5 Kreatinin.....	23
2.6 DNA <i>Adduct</i> sebagai Biomarker Risiko Kanker.....	24
2.7 Identifikasi 8-Hidroksi-2'-Deoksiganosin (8-OHdG) pada Urin	25
BAB 3 METODE PENELITIAN.....	30
3.1 Lokasi Penelitian	30
3.2 Alat dan Bahan	30
3.2.1 Alat	30
3.2.2 Bahan Kimia.....	31
3.2.3 Bahan Biologi.....	31
3.3 Metode Kerja.....	31
3.3.1 Pengambilan Sampel Urin.....	31
3.3.2 Preparasi Reagen	32
3.3.3 Verifikasi Metode.....	33
3.3.4 Analisa 8-Hidroksi-2'-Deoksiganosin pada Sampel Urin.....	34
3.3.5 Analisis Jumlah Kreatinin	34

3.3.6 Uji Statistik.....	35
BAB 4 HASIL DAN PEMBAHASAN	37
4.1 Deskripsi Sampel.....	37
4.2 Verifikasi Metode Analisis 8-OHdG.....	40
4.2.1 Kondisi Optimum Analisis	40
4.2.2 Kurva Kalibrasi 8-OHdG	42
4.2.3 Batas Deteksi (LOD) dan Batas Kuantifikasi (LOQ).....	42
4.2.4 Uji Keterulangan (Presisi)	42
4.3 Hasil Pengukuran Kadar 8-OHdG dalam Sampel Urin	42
4.4 Hasil Pengukuran Kreatinin	51
BAB 5 PENUTUP	55
5.1 Kesimpulan.....	55
5.2 Saran.....	56
DAFTAR PUSTAKA	57



DAFTAR GAMBAR

Gambar 2.1	Struktur Basa-Basa DNA.....	4
Gambar 2.2	Struktur DNA <i>Double Helix</i>	5
Gambar 2.3	Sumber Pembentukan Radikal Bebas	8
Gambar 2.4	<i>Oxidative Stress</i>	9
Gambar 2.5	Mekanisme Pengrusakan Sel Akibat <i>Oxidative Stress</i>	11
Gambar 2.6	Mekanisme Perbaikan Kerusakan DNA dengan BER dan NER... ..	16
Gambar 2.7	Mekanisme Perbaikan Kerusakan DNA dengan MMR.....	17
Gambar 2.8	Faktor-Faktor Penyebab Kanker	18
Gambar 2.9	Kejadian Kanker di Dunia (2008).....	19
Gambar 2.10	Kejadian Kanker di Indonesia (2008).....	19
Gambar 2.11	Hubungan DNA <i>Adduct</i> dengan Proses Karsinogenesis.....	20
Gambar 2.12	Mekanisme Pembentukan Kreatinin	24
Gambar 2.13	Struktur Basa Guanin Normal dan Basa Guanin Termodifikasi (8-OHdG).....	25
Gambar 2.14	Mekanisme Pembentukan 8-OHdG	28
Gambar 4.1	Jumlah Rokok yang Dihisap per Hari	38
Gambar 4.2	Lama Merokok	38
Gambar 4.3	Kromatogram Larutan Standar 8-OHdG 800 ppb.....	40
Gambar 4.4	Kromatogram Sampel Urin	41
Gambar 4.5	Kromatogram Sampel Urin dengan Penambahan Larutan Standar 8-OHdG 800 ppb (1:1).....	41
Gambar 4.6	Konsentrasi 8-OHdG pada Sampel Penderita Kanker Payudara ..	45
Gambar 4.7	Konsentrasi 8-OHdG pada Sampel Kontrol Perempuan.....	45
Gambar 4.8	Konsentrasi 8-OHdG pada Sampel Perokok	48
Gambar 4.9	Konsentrasi 8-OHdG pada Sampel Kontrol Laki-Laki.....	48
Gambar 4.10	Konsentrasi Kreatinin pada Sampel Penderita Kanker Payudara .	52
Gambar 4.11	Konsentrasi Kreatinin pada Sampel Perokok.....	52
Gambar 4.12	Konsentrasi Kreatinin pada Sampel Kontrol Wanita	53
Gambar 4.13	Konsentrasi Kreatinin pada Sampel Kontrol Pria	53

DAFTAR TABEL

Tabel 2.1 Jenis-Jenis Radikal Bebas.....	6
Tabel 4.1 Kriteria Sampel yang Dipilih.....	39
Tabel 4.2 Rerata Konsentrasi 8-OHdG dalam Sampel.....	49



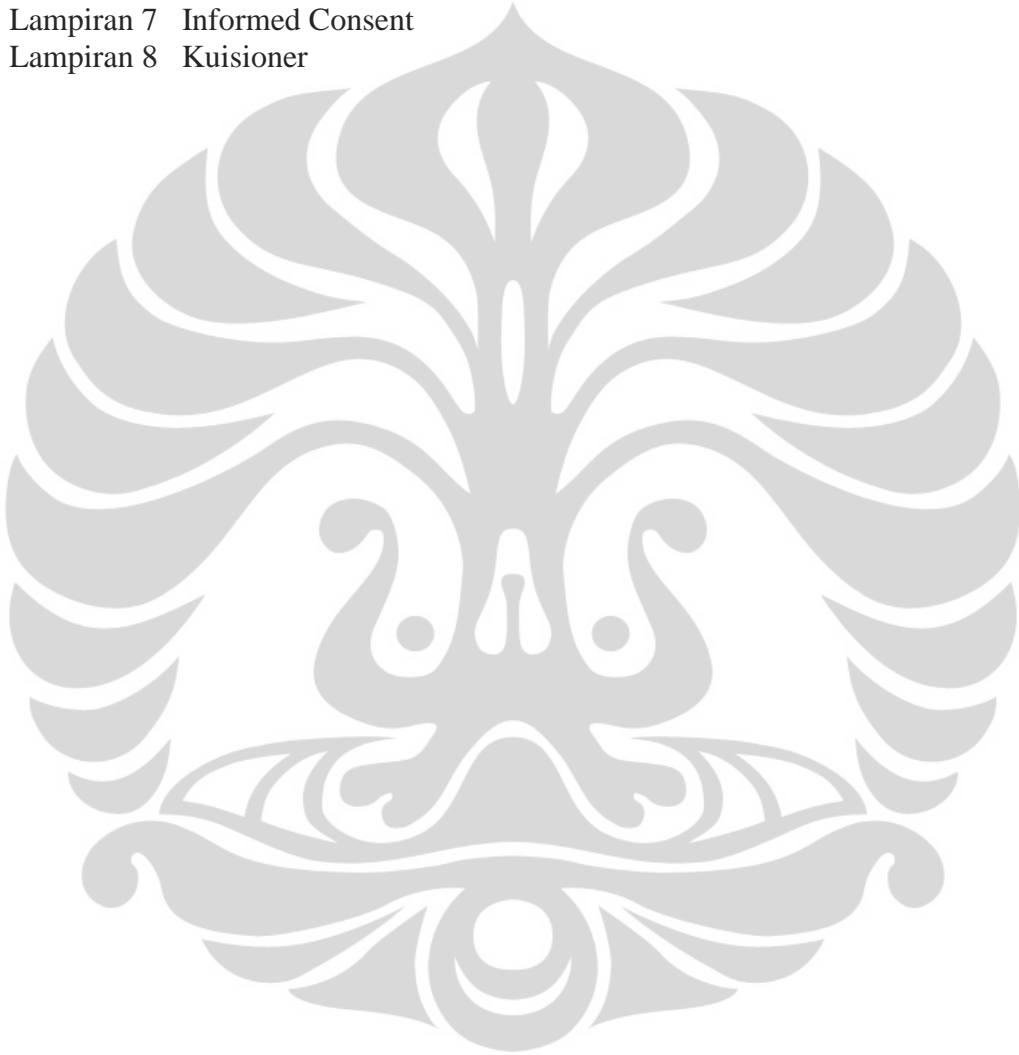
DAFTAR BAGAN

Bagan 3 Skema Umum Penelitian.....	30
------------------------------------	----



DAFTAR LAMPIRAN

- Lampiran 1 Bagan Kerja
- Lampiran 2 Data Kondisi Analisis 8-OHdG
- Lampiran 3 Data Konsentrasi Kreatinin dalam Sampel Urin
- Lampiran 4 Data Kuantifikasi 8- OHdG dalam Sampel
- Lampiran 5 Data Kuantifikasi 8- OHdG per Kreatinin
- Lampiran 6 Perhitungan Statistik Anova
- Lampiran 7 Informed Consent
- Lampiran 8 Kuisisioner



BAB 1 PENDAHULUAN

1.1 Latar Belakang

Kanker merupakan salah satu penyakit berbahaya dan mematikan yang dapat menyerang berbagai organ tubuh. Dewasa ini, kanker tidak lagi menjadi istilah yang asing di masyarakat. Secara definisi, kanker atau tumor ganas merupakan suatu keadaan di mana terjadi pertumbuhan yang tidak normal dan tidak terkendali dari suatu sel hidup, serta dapat menyebar ke sel lain di dalam tubuh.

Menurut data *International Agency for Research on Cancer* (IARC) pada tahun 2008, telah terjadi sebanyak 12,7 juta kasus kanker baru di seluruh dunia dengan angka kematian sebesar 7,6 juta. Pada kaum pria, kanker paru-paru merupakan kasus yang paling banyak terjadi (16,5% total kasus) dan menjadi penyebab terbesar (22,5%) kematian. Sementara itu, untuk kaum wanita, kasus utama ialah kanker payudara dengan angka kejadian 22,9% dan menyebabkan 13,7% kematian. Jika direratakan untuk kedua jenis kelamin, kanker payudara menempati urutan teratas (38,9% total kasus) kejadian kanker di dunia. Sementara itu, sebanyak 18,6% dari total kasus kanker payudara di Indonesia juga berakhir dengan kematian.

Hanya 5-10% dari total kasus kanker pada tahun 2008 yang bisa dikaitkan dengan faktor kerusakan genetik, dimana sisanya 90-95% dipengaruhi oleh faktor lingkungan dan cara hidup (*lifestyle*). Faktor *lifestyle* mencakup aktivitas merokok, diet (daging merah, makanan yang digoreng), alkohol, paparan sinar UV, polutan lingkungan, infeksi, stres, obesitas, dan aktivitas fisik. Aktivitas merokok menjadi penyebab terbesar (25-30%) – selain faktor diet - atas terjadinya kematian akibat kanker [Anand & Kunnumara, *et al.*, 2008].

Faktor-faktor penyebab di atas dapat menghasilkan spesies reaktif yang akan berinteraksi dengan makromolekul, seperti DNA, protein, dan lipid. Reaksi penyerangan spesies reaktif pada molekul DNA akan menyebabkan terjadinya modifikasi atau kerusakan pada struktur DNA dan mempengaruhi informasi genetik yang terkandung di dalamnya. Akibat lebih jauhnya adalah

ketidakmampuan enzim untuk mengenali molekul DNA tersebut dan memicu terbentuknya sel lain yang tidak dapat dikendalikan pertumbuhannya (sel kanker).

Deteksi terhadap kerusakan DNA ini umumnya terjadi terlambat, yaitu saat sel kanker telah menyebar ke sel lain di dalam tubuh (mencapai stadium). Hal ini disebabkan oleh kurangnya informasi dan pengetahuan yang dapat digunakan untuk dapat mendeteksi risiko kanker secara dini. Untuk itu diperlukan pengembangan metode-metode baru untuk mendeteksi pembentukan sel kanker secara lebih dini untuk menghindari atau meminimalisasi kerusakan yang terjadi.

Seiring dengan perkembangan ilmu pengetahuan, telah dikembangkan metode untuk mendeteksi dini risiko kanker, yaitu dengan identifikasi produk reaksi yang terbentuk saat spesies reaktif berinteraksi secara kimiawi dengan DNA, yaitu DNA *adduct* yang merupakan bagian genotoksisitas. DNA *adduct* merupakan biomarker (penanda biologik) yang dapat digunakan sebagai indikasi terjadinya kerusakan DNA (genotoksik) akibat paparan senyawa-senyawa karsinogen/mutagen dalam jangka panjang (kronis). Salah satu DNA *adduct* yang dapat digunakan dalam identifikasi ini adalah 8-Hidroksi-2'-Deoksiguanosin (8-OHdG) yang merupakan bentuk modifikasi basa guanin DNA pada posisi C-8 akibat adisi radikal hidroksil. Senyawa 8-OHdG dapat diekskresikan melalui urin. Keberadaan 8-OHdG dalam urin menggambarkan tingkat kerusakan oksidatif yang terjadi pada DNA.

1.2 Perumusan Masalah

Kanker telah menjadi salah satu penyebab utama kematian di dunia. Kanker umumnya terdeteksi setelah mencapai tingkat kerusakan sel yang parah, yaitu saat sel kanker telah menyebar ke sel lain dalam tubuh. Hal inilah yang menyebabkan tingginya angka kematian akibat kanker. Untuk itu, diperlukan suatu metode untuk mendeteksi kanker lebih dini, sehingga kerusakan yang lebih parah dapat dihindari. Pada penelitian ini akan dilakukan identifikasi senyawa 8-OHdG yang merupakan sebuah DNA *adduct* yang terbentuk akibat interaksi antara spesies reaktif dengan basa guanin DNA di dalam sel. Kadar 8-OHdG yang teridentifikasi dapat menggambarkan tingkat kerusakan oksidatif yang disebabkan

oleh spesies reaktif di dalam tubuh. Pengukuran akan dilakukan terhadap urin penderita kanker, perokok aktif, dan non perokok sebagai kontrol.

1.3 Tujuan Penelitian

Penelitian ini dilakukan dengan tujuan untuk :

- Melakukan studi pendahuluan melalui deteksi 8-OHdG pada sampel urin penderita kanker, perokok aktif, dan non perokok (kontrol).
- Membandingkan konsentrasi 8-Hidroksi-2'-Deoksiganosin (8-OHdG) yang terbentuk pada sampel urin penderita kanker dengan sampel perokok aktif dan sampel non perokok (kontrol).

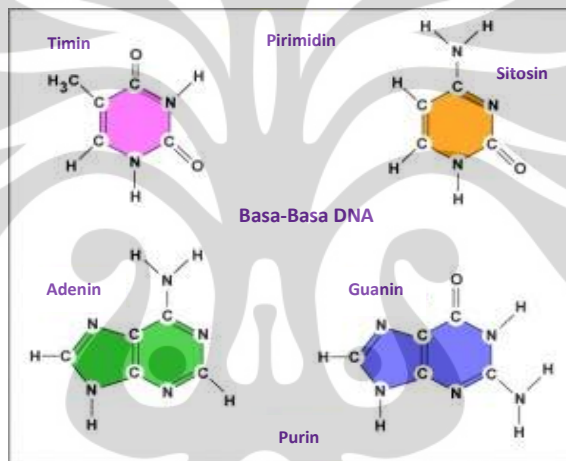
1.4 Hipotesis

- Adanya kerusakan DNA yang disebabkan oleh spesies reaktif yang terbentuk melalui berbagai faktor memicu pembentukan DNA *adduct* 8-Hidroksi-2'-Deoksiganosin (8-OHdG) yang dapat diidentifikasi di dalam urin. Sampel urin penderita kanker memiliki tingkat kerusakan DNA (8-OHdG) yang lebih tinggi kadarnya daripada sampel urin perokok aktif dan sampel non perokok (kontrol).

BAB 2 TINJAUAN PUSTAKA

2.1 Asam Deoksiribonukleat (DNA)

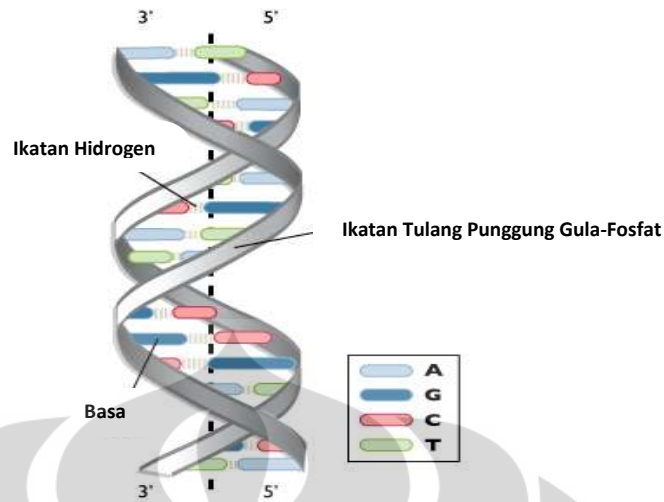
DNA (*deoxyribonucleic acid*) merupakan materi genetik pada sel yang dimiliki oleh hampir semua organisme hidup. Sebagian besar DNA berada di dalam inti sel (DNA inti) dan sebagian kecilnya ditemukan di dalam mitokondria (DNA mitokondria). DNA mengandung semua informasi yang diperlukan untuk sintesis biomolekul dalam sel. DNA manusia memiliki sekitar 3 miliar pasangan basa yang terdiri atas basa adenin (A), guanin (G), sitosin (C), dan timin (T).



Gambar 2.1 Struktur Basa-Basa DNA

[Sumber : <http://yoga8pratama.wordpress.com/2008/10/13/deskripsi-rinci-struktur-polinukleotida-dan-perbedaan-kimiawi-antara-dna-dan-rna/>]

Urutan basa-basa ini menentukan informasi yang tersimpan untuk pembangunan dan pemeliharaan organisme. Basa-basa DNA berpasangan satu dengan lainnya, yaitu A dengan T dan G dengan C untuk membentuk unit pasangan basa. Masing-masing basa akan berikatan dengan sebuah molekul gula dan sebuah molekul fosfat. Gabungan sebuah basa, gula, dan fosfat disebut sebagai nukleotida. Nukleotida-nukleotida tersusun dalam dua rantai panjang yang berbentuk spiral dan disebut sebagai ikatan ganda (*double helix*).



Gambar 2.2 Struktur DNA *Double Helix*

[Sumber : <http://sciencebiotech.net/mengenal-dna-lebih-dekat-anatomi-dna/>]

2.2 Kerusakan DNA (Genotoksisitas)

Genotoksisitas merupakan suatu peristiwa dimana gen yang terdiri dari basa-basa DNA mengalami keracunan atau kerusakan akibat interaksi kimiawi dengan sumber-sumber endogenus dan eksogenus.

Sel tubuh secara konstan mengalami paparan terhadap senyawa karsinogen yang berasal dari reaksi metabolisme normal tubuh yang berada dalam bentuk spesies oksigen reaktif (*reactive oxygen species*, ROS) dan spesies nitrogen reaktif (*reactive nitrogen species*, RNS). Ketika senyawa karsinogen masuk ke dalam tubuh dan teraktivasi, senyawa ini akan mengalami interaksi kovalen dengan DNA untuk membentuk DNA *adduct* (DNA termodifikasi). Interaksi ini juga dapat menyebabkan pemutusan rantai DNA. Puluhan ribu kerusakan DNA muncul dalam tiap sel setiap hari. Jika pertahanan alami tubuh tidak dapat memperbaiki kerusakan tersebut dengan baik, ditambah dengan terjadinya kerusakan pada DNA yang mengontrol siklus sel (termasuk proliferasi dan apoptosis/progam kematian sel), berarti telah tercapai satu tahap kritis dalam pertumbuhan kanker. Kegagalan sistem antioksidan enzimatik, endogenus, dan nutrisi dapat menyebabkan kerusakan mutagenik DNA, sama seperti disregulasi kontrol siklus sel yang menghasilkan karsinogenesis [Hwang & Bowen., 2007].

2.2.1 Radikal Bebas sebagai Sumber Kerusakan DNA

Radikal bebas dan senyawa oksigen/nitrogen/klorin reaktif lainnya secara luas dipercaya berkontribusi dalam pertumbuhan penyakit yang berkaitan dengan usia, dan mungkin terhadap proses penuaan itu sendiri dengan menyebabkan timbulnya *oxidative stress* dan *oxidative damage* [Halliwell & Whiteman., 2004].

Istilah radikal bebas mengacu pada spesies molekular yang memiliki satu atau lebih elektron tidak berpasangan pada orbital terluarnya, sebuah karakteristik yang menyebabkan mereka bersifat tidak stabil dan sangat reaktif untuk bereaksi dengan molekul lain dan menghasilkan spesies yang lebih stabil [Adly., 2010]. Karena sifat inilah mengapa ketika spesies reaktif bereaksi dengan DNA, RNA, protein, dan lipid, dapat memicu toksisitas seluler [Ziech, *et al.*, 2011]. Spesies reaktif terdiri dari ROS dan RNS. ROS merupakan istilah kolektif yang terdiri dari radikal oksigen dan non radikal tertentu yang bertindak sebagai agen pengoksidasi dan mudah dikonversi menjadi bentuk radikal (HOCl, HOBr, O₃, ONOO⁻, ¹O₂, H₂O₂). Dengan kata lain, semua radikal oksigen adalah ROS, tetapi tidak semua ROS adalah radikal oksigen. RNS juga merupakan istilah kolektif yang terdiri dari radikal oksida nitrit dan nitrogen dioksida, serta non radikal seperti HNO₂ dan N₂O₄ [Halliwell & Whiteman., 2004].

Tabel 2.1 Jenis-Jenis Radikal Bebas

Radikal Bebas	Non Radikal
Spesies Oksigen Reaktif (ROS)	
Superoksida, O ₂ ^{-*}	Hidrogen peroksida, H ₂ O ₂
Hidroksil, OH [*]	Asam hipobromo, HOBr ^b
Hidroperoksil, HO ₂ [*]	Asam hipokloro, HOCl ^c
Peroksil, RO ₂ [*]	Ozone, O ₃
Alkoksil, RO [*]	Oksigen singlet, O
Karbonat, CO ₃ ^{-*}	Peroksida organik, ROOH
Karbon dioksida, CO ₂ ^{-*}	Peroksinitrit, ONOO ^{-d}
	Asam peroksonitro, ONOOH ^d
Spesies Klor Reaktif (RCS)	
Atom klorin, Cl [*]	Asam hipokloro, HOCl ^c
	Nitril (nitronium) klorida, NO ₂ Cl ^c
	Kloroamin

	Gas klorin, Cl ₂
Spesies Nitrogen Reaktif (RNS)	
Nitrit oksida, NO*	Asam nitrit, HNO ₂
Nitrogen dioksida, NO ₂ *	Kation nitrosil, NO ⁺
	Anion nitrosil, NO ⁻
	Dinitrogen tetraoksida, N ₂ O ₄
	Dinitrogen trioksida, N ₂ O ₃
	Peroksinitrit, ONOO ^{-d}
	Asam peroksonitrit, ONOOH
	Kation nitronium (nitril), NO ₂ ⁺
	Alkil peroksonitrit, ROONO
	Nitril (nitronium) klorida, NO ₂ Cl ^c

[Sumber : Halliwell & Whiteman., 2004 (dengan pengolahan kembali)]

Radikal bebas hidroksil dianggap sebagai senyawa ROS yang paling sering berinteraksi dengan basa DNA, deoksiribosa, dan nukleotida bebas. Radikal bebas hidroksil memiliki kereaktifan yang tinggi dan masa hidup yang singkat. Oleh karena itu, migrasi radikal hidroksil di dalam sel sangat terbatas dan bereaksi cepat dengan komponen seluler dalam jarak yang dekat [Klaunig, *et al.*, 2011].

Selain melalui metabolisme oksidatif normal di dalam mitokondria, ROS juga dihasilkan melalui ikatan membran dan oksidasi seluler, sitokrom P450, retikulum endoplasma, peroksisom, logam koordinasi transisi (misalnya reaksi Fenton), dan pengaruh lingkungan termasuk sinar UV dan merokok tembakau [Saenz., 2009].

Jika dikelompokkan, radikal bebas yang menyebabkan kerusakan DNA dapat berasal dari dua sumber, yaitu :

1. Sumber endogenus

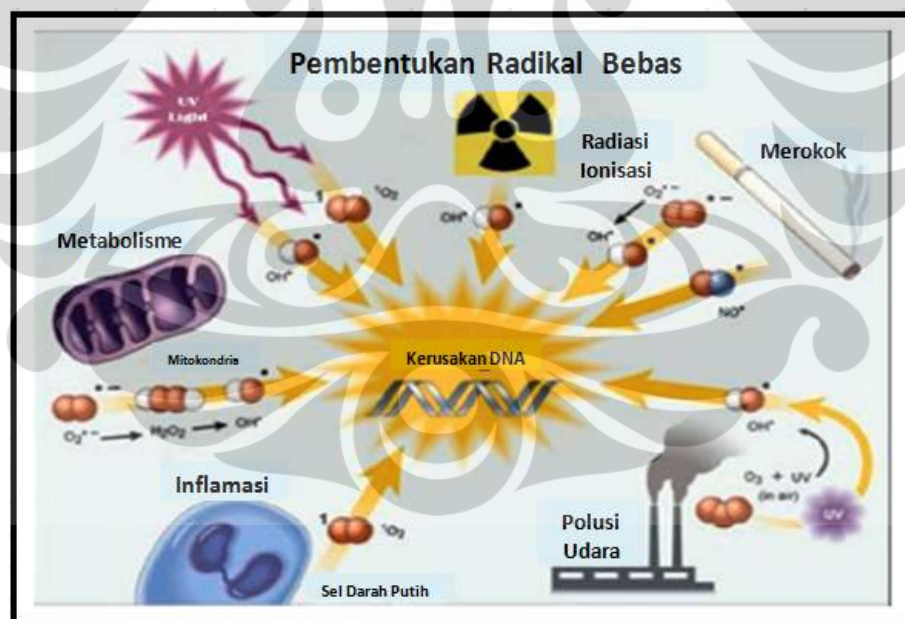
Dalam kelompok ini termasuk metabolisme oksidatif normal di dalam mitokondria, peroksisom, aktivasi sel inflamatori [Klaunig, *et al.*, 2011], metabolisme arginin, stimulasi fagositosis oleh senyawa patogen atau lipopolisakarida, dan metabolisme sitokrom P450 [Adly., 2010].

2. Sumber eksogenus

Dalam kelompok ini termasuk bahaya kimia (logam berat seperti merkuri, timah, dan kadmium, serta obat anti kanker, anestetik, dan analgesik, alkohol, aktivitas merokok, diet), fisik (radiasi, gelombang elektromagnetik), dan biologi (bakteri, jamur, virus, dan parasit) [Adly., 2010].

Normalnya, 1-3% dari total oksigen yang dikonsumsi dikonversi menjadi ROS di dalam mitokondria, sehingga, makin banyak oksigen yang dikonsumsi, makin banyak ROS yang dihasilkan [Saenz., 2009].

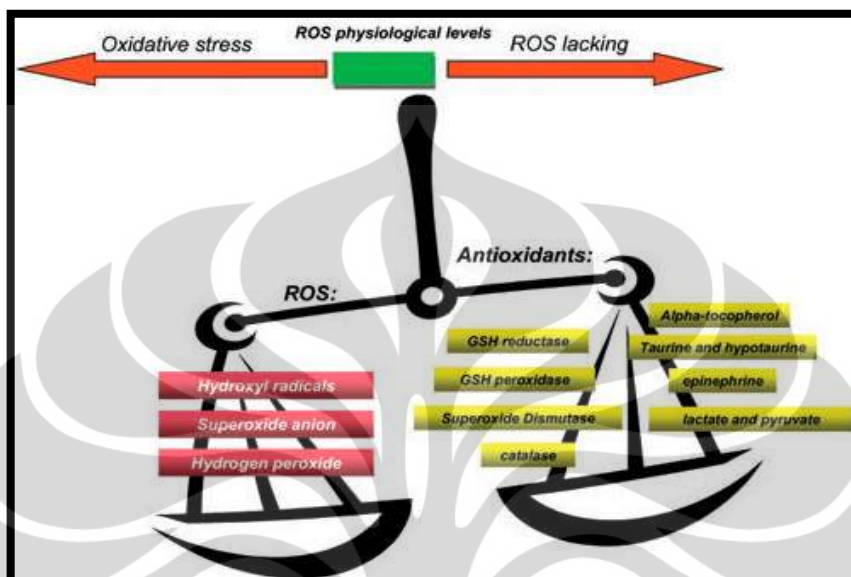
Pada level rendah, ROS sebenarnya dibutuhkan dalam pemberian sinyal untuk perkembangan, pembelahan, apoptosis, pengaturan gen, proliferasi sel, dan pertumbuhan sel [Saenz., 2009]. Selain itu, ROS juga memegang peranan penting dalam banyak reaksi fisiologis, seperti oksidasi katalitik beberapa senyawa endogenus dan xenobiotika [Adly., 2010].



Gambar 2.3 Sumber Pembentukan Radikal Bebas

[Sumber : Adly., 2010 (dengan pengolahan kembali)]

Oxidative stress merupakan suatu keadaan yang merujuk pada ketidakseimbangan antara produksi spesies reaktif dan ketersediaan antioksidan di dalam tubuh.



Gambar 2.4 *Oxidative Stress*

[Sumber : Adly., 2010]

Di dalam Halliwell & Whiteman (2004), disebutkan bahwa *oxidative stress* dapat dihasilkan akibat :

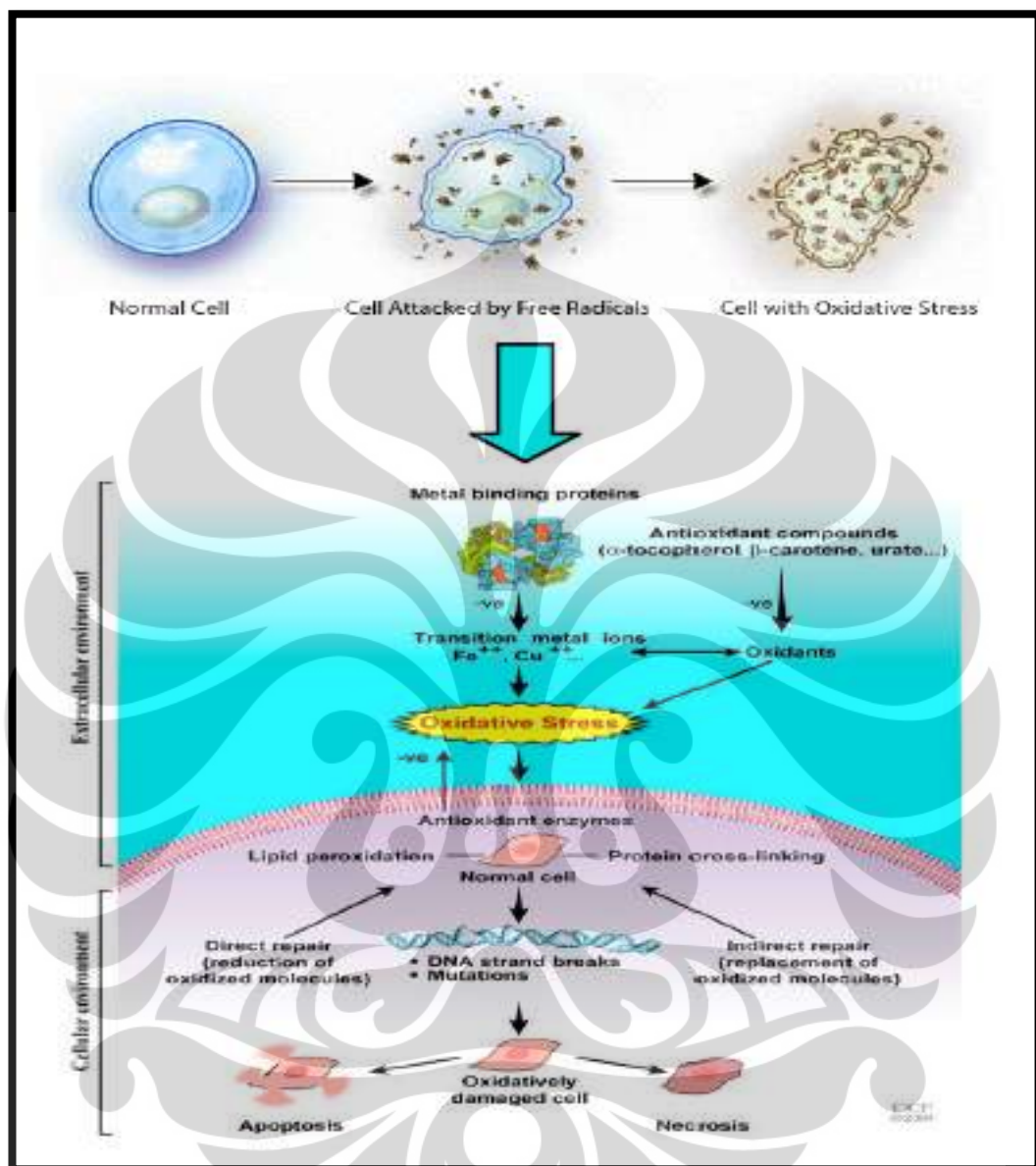
1. Penurunan level antioksidan. Sebagai contoh, mutasi mempengaruhi aktivitas enzim antioksidan seperti CuZnSOD atau glutation peroksida, atau racun yang mengosongkan pertahanan antioksidan. Misalnya, banyak xenobiotika yang dimetabolisme melalui konjugasi dengan GSH ; dosis tinggi dapat menghabiskan GSH dan menyebabkan *oxidative stress*. Defisiensi terhadap mineral (Zn^{2+} , Mg^{2+} , Fe^{2+} , Cu^{2+} , Se) juga dapat menyebabkan *oxidative stress*.
2. Peningkatan produksi spesies reaktif. Sebagai contoh, melalui paparan sel atau organisme pada level O_2 yang tinggi atau pada senyawa toksin lain yang merupakan spesies reaktif (misal NO_2^*) atau yang dimetabolisme menjadi spesies reaktif (misal paraquat), atau kelebihan aktivitas dari sistem alami yang memproduksi beberapa spesies reaktif.

Sementara itu, *oxidative damage* ialah kerusakan biomolekul yang dapat disebabkan oleh serangan langsung spesies reaktif selama masa *oxidative stress*. Spesies reaktif ini dapat menyerang DNA, baik pada molekul gula, fosfat, ataupun basa purin dan pirimidin [Adly., 2010].

Oxidative stress memiliki beberapa konsekuensi, yaitu :

1. Adaptasi sel atau organisme terhadap pengaturan baru sistem pertahanan tubuh, yang dapat (a) melindungi dari kerusakan secara keseluruhan; (b) melindungi dari kerusakan dalam beberapa tingkat tapi tidak secara keseluruhan; atau (c) *overprotect* (sel tersebut kemudian akan menjadi resisten terhadap *oxidative stress* dengan level tinggi).
2. *Cell injury* : ini mencakup kerusakan (*oxidative damage*) pada beberapa atau semua target molekul : lipid, DNA, protein, karbohidrat, dll. *Oxidative damage* juga dapat terjadi selama masa adaptasi. Tidak semua kerusakan yang disebabkan oleh *oxidative stress* adalah *oxidative damage*. Sebagai contoh, kerusakan biomolekul dapat dihasilkan dari *oxidative stress* yang berkaitan dengan perubahan level ion (misal, Ca^{2+}) atau aktivasi protease.
3. Kematian sel : sel dapat (a) disembuhkan dari *oxidative damage* dengan memperbaikinya atau mengganti molekul yang rusak, atau (b) bertahan hidup dengan *oxidative damage* yang persisten, atau (c) mengalami kematian melalui *apoptosis* atau *necrosis* [Halliwell & Whiteman., 2004].

Mekanisme pengusakan sel akibat *oxidative stress*:



Gambar 2.5 Mekanisme Pengusakan Sel Akibat *Oxidative Stress*

[Sumber : Adly., 2010]

Seperti yang telah disebutkan sebelumnya bahwa *oxidative stress* terjadi karena adanya ketidakseimbangan antara produksi spesies reaktif dan antioksidan. Antioksidan didefinisikan sebagai substansi yang ketika berada pada konsentrasi rendah dibandingkan dengan substrat yang dapat teroksidasi, secara signifikan

dapat menunda atau mencegah oksidasi terhadap substrat tersebut [Halliwell & Whiteman., 2004].

Oxidative stress dapat memodulasi potensial redoks sel dan memodifikasi ekspresi gen, serta berpartisipasi pada fase promosi tumor dalam proses karsinogenesis. Jika pengaruh sumber endogenus dan eksogenus ROS ini tidak dapat diatasi oleh antioksidan, dapat berujung pada peningkatan *oxidative stress* dalam sel. *Oxidative stress* ini kemudian akan merusak makromolekul yang penting dan menghasilkan ketidakstabilan kromosom, mutasi genetik, dan atau modulasi pertumbuhan sel yang dapat berakhir dengan kanker [Klaunig, *et al.*, 2011].

2.2.2 Tipe Kerusakan DNA

Kerusakan DNA dapat terjadi dari interaksi bahan kimia, agen lingkungan (*external agent*) maupun kerusakan secara langsung (*spontaneous endogenous processes*) [Esteller, *et al.*, 1999].

- a. Kerusakan DNA secara langsung meliputi:
 - Metabolisme seluler. Kerusakan DNA karena proses seluler endogen meliputi: modifikasi basa dengan adanya perubahan kimia, ikatan kovalen antara basa yang berdekatan, kehilangan basa dan kerusakan DNA tipe tiga yaitu putusnya rantai ganda DNA.
 - Kesalahan replikasi
- b. Kerusakan DNA yang disebabkan oleh faktor eksternal meliputi:
 - Paparan terhadap sinar UV, seperti UV-sinar B (280-320 nm) menyebabkan ikatan silang antara basa sitosin dan timin yang berdekatan menciptakan dimer pirimidin.
 - Radiasi ion, yang akan menyebabkan *cross link* dan rusaknya rantai DNA.
 - Paparan terhadap bahan kimia, yang bersifat mutagenik/karsinogenik juga dapat mempengaruhi integritas DNA dan replikasinya.

2.2.3 Perbaikan Kerusakan DNA

Perbaikan (reparasi) merujuk pada sekumpulan proses dalam sel yang mengidentifikasi dan memulihkan kerusakan pada molekul DNA. Dalam sel manusia, baik aktivitas metabolisme normal maupun faktor lingkungan seperti cahaya ultraviolet dan radiasi dapat menyebabkan kerusakan DNA. Banyak diantara kerusakan ini berupa kerusakan struktural pada molekul DNA, sehingga dapat mengubah ataupun menghilangkan kemampuan sel untuk mentranskripsi gen [Esteller, *et al.*, 1999].

Kerusakan oksidatif DNA dapat diperbaiki oleh aktivitas serangkaian enzim, walaupun selama *oxidative stress*, level kerusakan DNA meningkat karena sistem perbaikannya tidak dapat menghilangkan DNA yang rusak dengan kecepatan yang cukup tinggi. Rendahnya aktivitas perbaikan DNA yang teroksidasi dapat meningkatkan risiko kanker karena meningkatkan akumulasi DNA yang rusak di dalam genom [Guarnieri, *et al.*, 2008].

Untuk melindungi diri dari ROS dan RNS, sel memiliki kemampuan antioksidan, baik secara enzimatik maupun non-enzimatik, termasuk molekul organik yang kecil. Antioksidan enzimatik yang mengubah ROS menjadi molekul yang kurang reaktif adalah superoksida dismutase (SOD), katalase (CAT), dan glutathione peroksida (GPx). Sementara itu, antioksidan non-enzimatik yaitu glutathione (GSH) yang teroksidasi menjadi glutathione disulfida (GSSG). Antioksidan non-enzimatik lainnya termasuk vitamin dari makanan seperti beta karoten (vitamin A), asam askorbat (vitamin C), dan tokoferol (vitamin E) [Saenz., 2010]. Senyawa antioksidan ini menyerang ROS sebelum mereka menyebabkan kerusakan pada berbagai molekul biologis dan menghindarkan penyebaran kerusakan oksidatif dengan mengganggu reaksi rantai radikal bebas. Antioksidan menyumbangkan sebuah elektron pada radikal bebas [Adly., 2010].

Walaupun spesies reaktif dapat merusak semua makromolekul biologis, kerusakan DNA merupakan yang paling serius. *Oxidative stress* dapat memicu kerusakan DNA inti dan DNA mitokondria, menyebabkan kesalahan dalam replikasi dan transkripsi DNA, pembelahan sel, dan fungsi mitokondria. Kapasitas antioksidan seluler secara aktif berpartisipasi dalam pemeliharaan integritas

genom. DNA inti juga dilindungi secara pasif melalui pengemasannya ke dalam sebuah kromatin oleh protein histon.

Sementara itu, protein, lipid, dan DNA mitokondria berada dekat dengan tempat penghasil ROS, sehingga mereka paling mudah diserang dan mengalami kerusakan oksidatif, walaupun sebagian besar genom mitokondria bermigrasi ke inti. Selain itu, juga karena kurangnya perlindungan dari protein histon. ROS secara progresif merusak DNA mitokondria dan rantai transfer elektron menghasilkan penurunan efisiensi metabolisme dan defisiensi produksi energi. Defisiensi ini berkaitan dengan peningkatan produksi ROS untuk menyerang sel dan mengakibatkan *oxidative stress*.

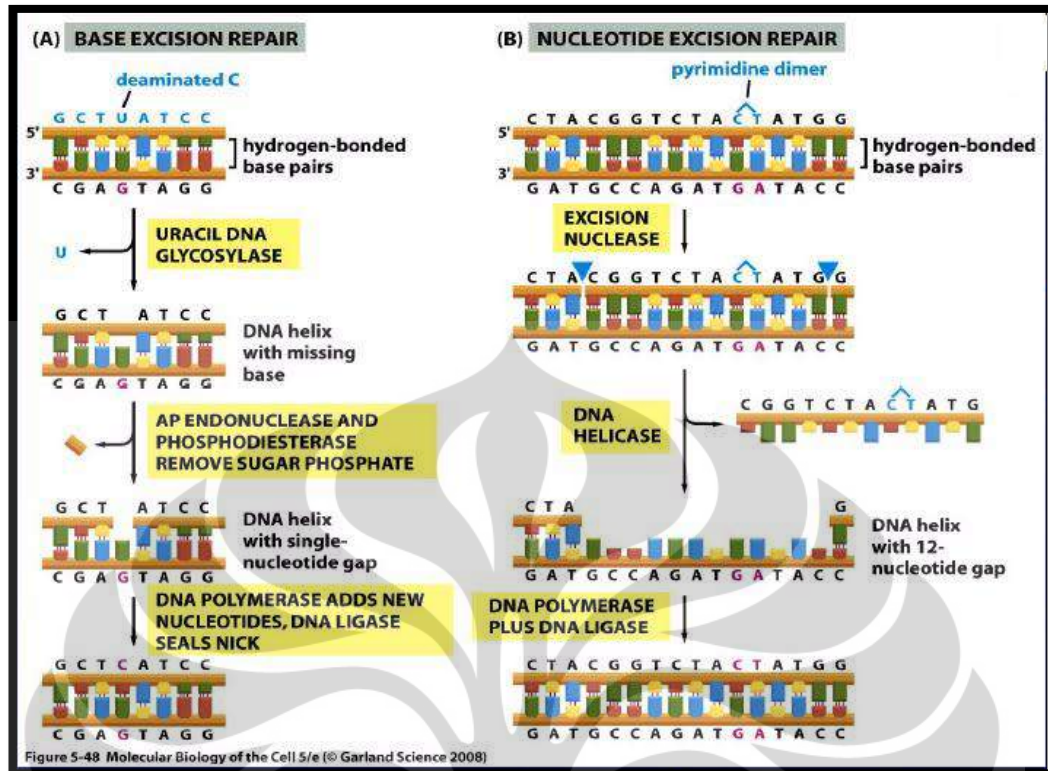
DNA nukleus mengandung miliaran pasangan basa yang mengkode sebagian besar biomolekul yang dibutuhkan untuk fungsi seluler. Perbaikan DNA di dalam nukleus sangat penting untuk pertahanan hidup dan evolusi. Meski sejak awal diduga bahwa DNA mitokondria kekurangan sistem yang efisien dalam perbaikan DNA dibandingkan dengan DNA nukleus, penelitian terbaru menunjukkan bahwa mitokondria memiliki kemampuan untuk memperbaiki kerusakan oksidatif pada DNA mitokondria (seperti kerusakan pada basa atau pemutusan rantai tunggal). Mitokondria mengandung *uracil DNA glycosylases*, *AP endonuclease*, dan *UV endonucleases*. Selain itu, jalur perbaikan pemutusan basa memegang peranan besar dalam perbaikan DNA mitokondria [Saenz., 2010].

Menurut Esteller, *et al* (1999), perbaikan kerusakan DNA dapat dilakukan dengan cara:

1. Apoptosis, yaitu mekanisme biologi yang merupakan salah satu jenis program kematian sel. Apoptosis digunakan oleh organisme multisel untuk membuang sel yang sudah tidak diperlukan oleh tubuh. Apoptosis dapat terjadi misalnya ketika sel mengalami kerusakan yang sudah tidak dapat diperbaiki lagi. Keputusan untuk melakukan apoptosis berasal dari sel itu sendiri, dari jaringan yang mengelilinginya, atau dari sel yang berasal dari sistem imun. Bila sel kehilangan kemampuan untuk melakukan apoptosis (misalnya karena mutasi), atau bila inisiatif untuk melakukan apoptosis

dihambat (oleh virus), sel yang rusak dapat terus membelah tanpa terbatas, yang akhirnya menjadi kanker.

2. *Damage reversal*, yaitu mekanisme perbaikan DNA oleh enzim dengan langsung menggantikan DNA yang rusak tanpa perlu memotong DNA.
3. *Damage removal*, yaitu mekanisme perbaikan DNA yang lebih kompleks karena melibatkan penggantian DNA dengan dipotong-potong. Ada beberapa tipe *damage removal*, yaitu:
 - *Homologous recombination* : memperbaiki putusnya rantai ganda dan mencakup pertukaran sekuen nukleotida antara dua rantai DNA yang mirip (homolog).
 - *Base excision repair* (BER), yaitu perbaikan kerusakan pada basa tunggal yang disebabkan oleh oksidasi, alkilasi, hidrolisis, atau deaminasi. Basa yang rusak akan dihilangkan oleh enzim DNA glikosilase. Ikatan fosfodiester yang tersisa akan dipotong oleh AP endonuklease. Bagian yang hilang kemudian disintesis kembali oleh DNA polimerase, dan DNA ligase melakukan langkah penyegelan akhir.
 - *Nucleotide excision repair* (NER), memotong pada salah satu segmen DNA yang mengalami kerusakan. Sinar UV dapat menyebabkan terbentuknya dimer dari basa pirimidin. Kesalahan ini diperbaiki oleh enzim DNA helikase dengan memotong rantai DNA pada satu tempat tertentu, yang kemudian oleh DNA polimerase akan disintesis kembali bagian yang hilang dan diakhiri dengan penyegelan oleh DNA ligase.

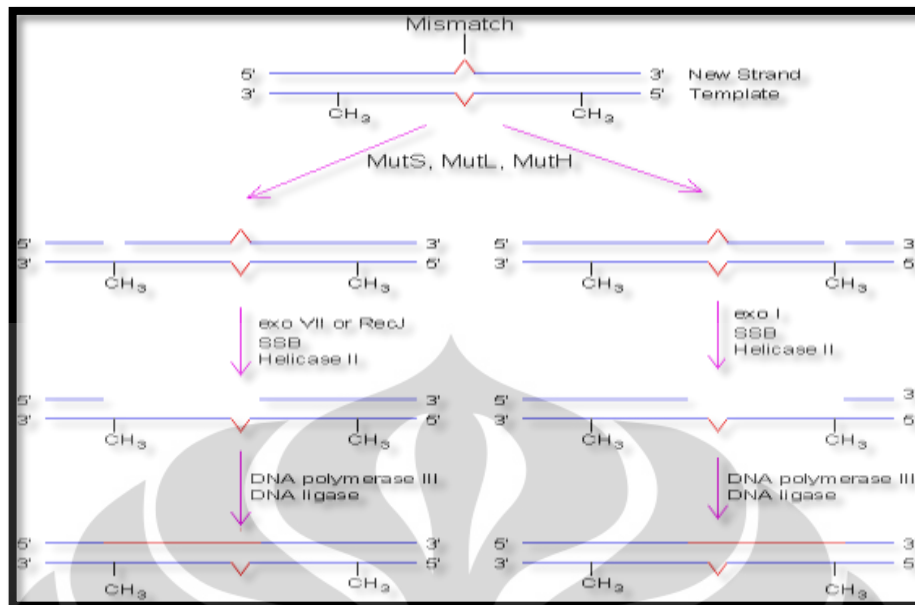


Gambar 2.6 Mekanisme Perbaikan Kerusakan DNA dengan BER dan NER

[Sumber: Esteller, *et al.*, 1999]

- *Mismatch repair* (MMR), mengoreksi kesalahan replikasi dan rekombinasi DNA yang menghasilkan kesalahan pada pasangan nukleotida. Setelah replikasi DNA, rantai *template* mengalami metilasi, sedangkan rantai yang baru disintesis belum termetilasi. Dengan demikian, rantai *template* dan rantai baru dapat dibedakan [DNA Repair Mechanisms].

Proses perbaikan dimulai oleh protein MutS yang berikatan pada pasangan basa yang mengalami *mismatch*. Kemudian, protein MutL mengaktifasi MutH yang berikatan pada rantai baru. MutH yang teraktivasi akan memotong rantai baru pada titik yang tidak termetilasi. Eks nuklease, protein SSB, dan helikase akan menghilangkan segmen dari titik pemotongan hingga titik *mismatch* [Esteller, *et al.*, 1999].



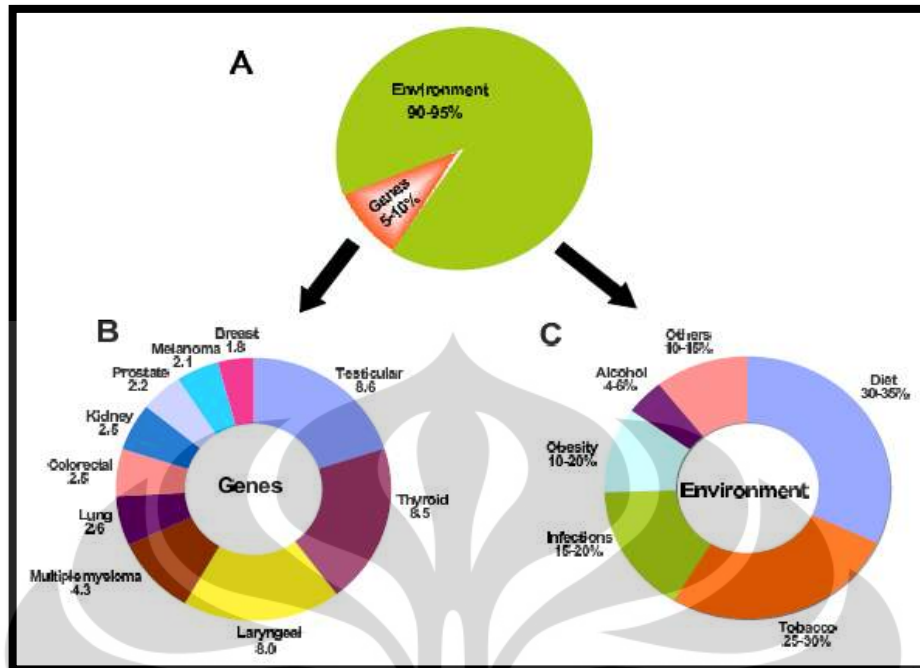
Gambar 2.7 Mekanisme Perbaikan Kerusakan DNA dengan MMR

[Sumber : *DNA Repair Mechanisms*]

2.3 Kanker

Kanker adalah penyakit yang dapat menyerang dan mematikan berbagai organ tubuh. Kanker dimulai dari beberapa sel yang tumbuh sangat cepat dengan cara yang tidak normal dan menyebabkan timbulnya benjolan (tumor). Kadang-kadang, tumor bisa hilang tanpa diobati. Tetapi seringkali tumor membesar dan menyebar hingga menimbulkan masalah di beberapa bagian tubuh. Inilah yang disebut kanker.

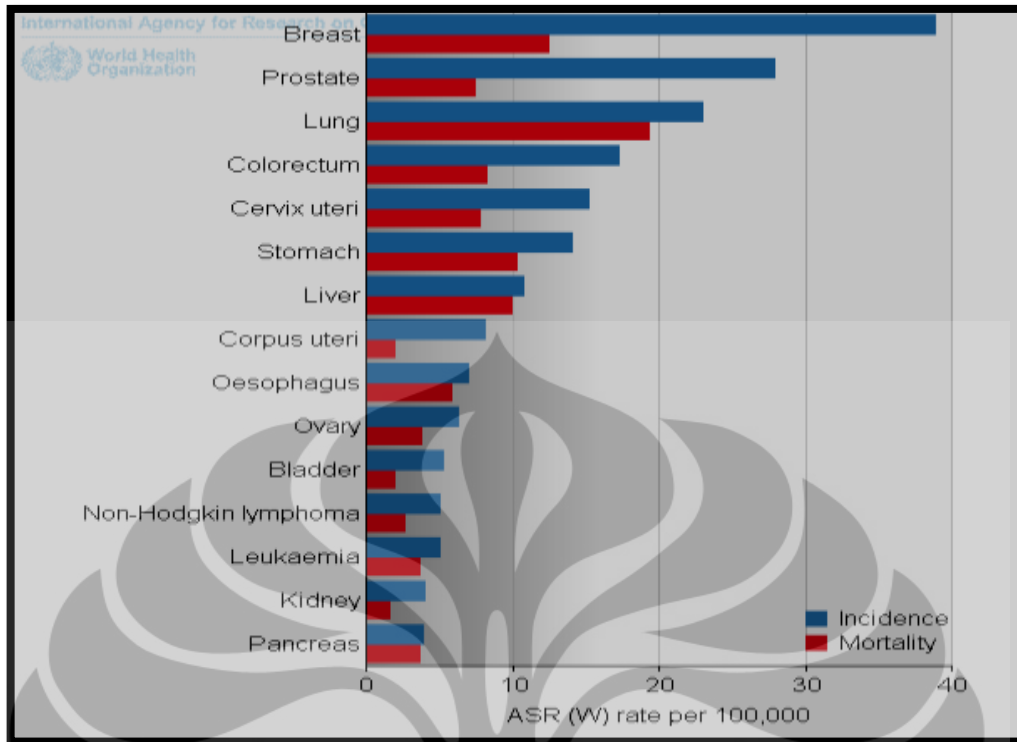
Kanker dapat disebabkan oleh faktor internal (seperti mutasi yang diwariskan, hormon, dan kondisi imun) dan faktor kimia di lingkungan (seperti kandungan bahan kimia dalam rokok dan alkohol, obesitas, diet, radiasi, dan infeksi organisme) [Anand & Kunnumara, *et al.*, 2008].



Gambar 2.8 Faktor-Faktor Penyebab Kanker

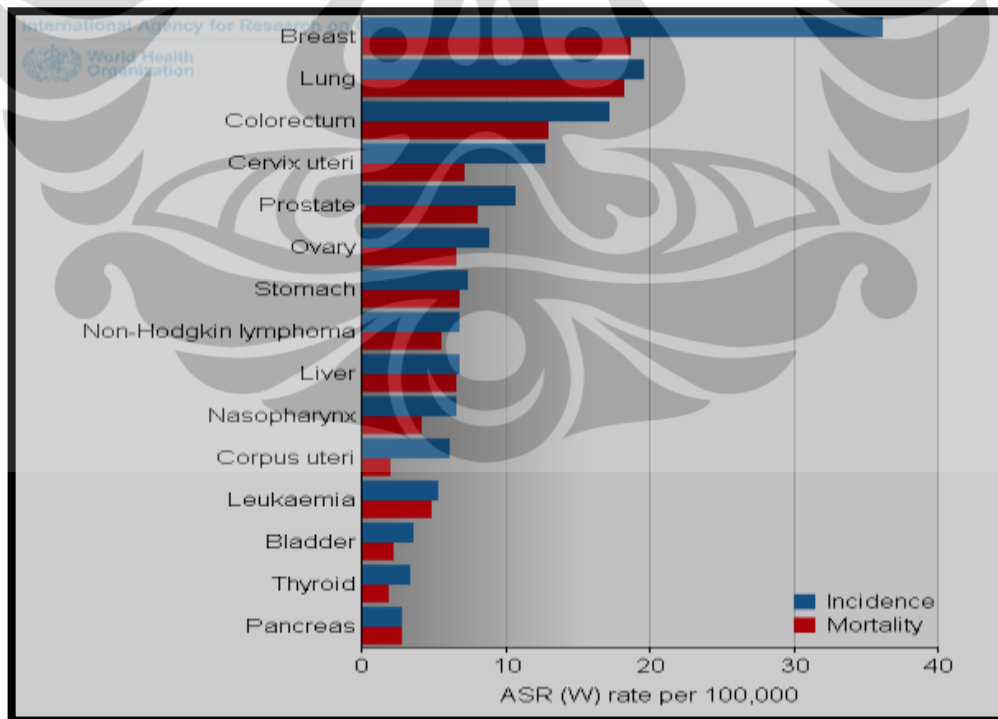
[Sumber : Anand & Kunnumara *et al.*, 2008]

Kejadian kanker cenderung mengalami peningkatan dari tahun ke tahun. Menurut data *International Agency for Research on Cancer (IARC)* pada tahun 2008, telah terjadi sebanyak 12,7 juta kasus kanker baru di seluruh dunia dengan angka kematian sebesar 7,6 juta. Pada kaum pria, kanker paru-paru merupakan kasus yang paling banyak terjadi (16,5% total kasus) dan menjadi penyebab terbesar (22,5%) kematian. Sementara itu, untuk kaum wanita, kasus utama ialah kanker payudara dengan angka kejadian 22,9% dan menyebabkan 13,7% kematian. Jika direratakan untuk kedua jenis kelamin, kanker payudara menempati urutan teratas (38,9% total kasus) kejadian kanker di dunia. Sementara itu, sebanyak 18,6% dari total kasus kanker payudara di Indonesia juga berakhir dengan kematian.



Gambar 2.9 Kejadian Kanker di Dunia (2008)

[Sumber : IARC GLOBOCAN 2008]

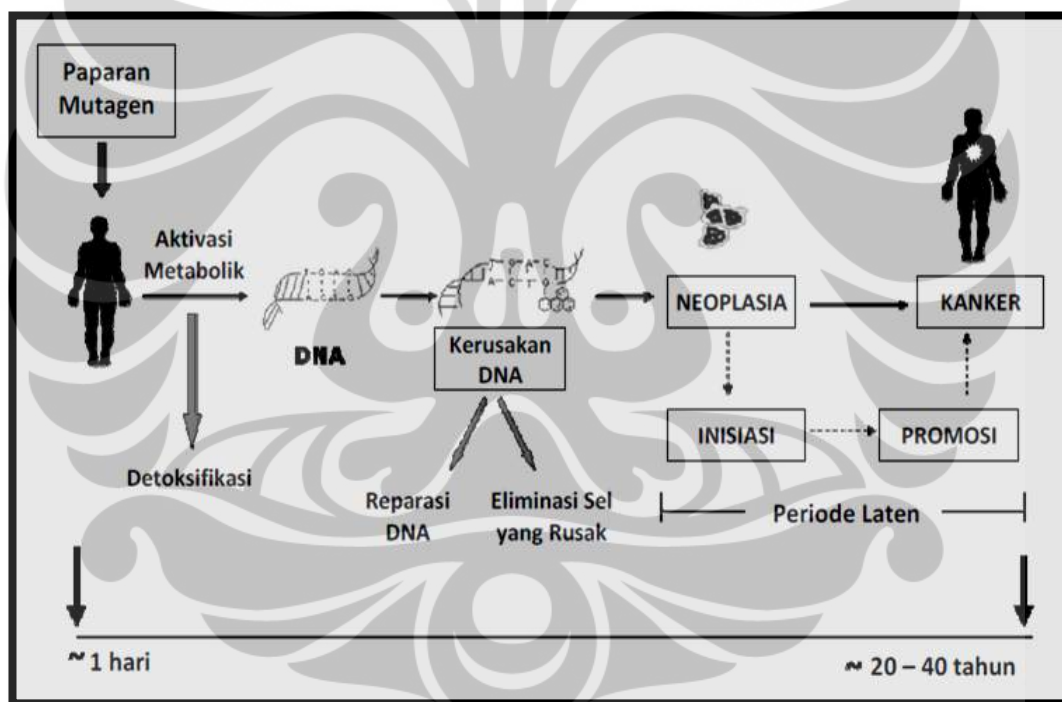


Gambar 2.10 Kejadian Kanker di Indonesia (2008)

[Sumber : IARC GLOBOCAN 2008]

2.3.1 Karsinogenesis

Kanker terbentuk melalui sebuah rangkaian proses karsinogenesis, yaitu suatu proses dimana sel mengalami beberapa perubahan yang menyebabkannya menjadi abnormal, dan memulai fase dimana pertumbuhan menjadi tidak terkendali yang menyebabkan sel-sel tersebut menyebar. Proses karsinogenesis selalu diawali dengan proses metagenesis, yaitu perubahan di dalam rangkaian nukleotida suatu gen pada suatu organisme. Perubahan ini akan menimbulkan ciri genetis baru atau genotip yang berubah (mutasi). Setelah terjadi mutasi, gen awal menjadi tidak dikenali lagi oleh sistem enzim di dalam sel. Akibatnya, pertumbuhan sel tersebut menjadi tidak terkendali dan sel mengalami progresi (bertambah besar ukurannya).



Gambar 2.11 Hubungan DNA Adduct dengan Proses Karsinogenesis

[Sumber : Beach & Gupta., 1992 (dengan pengolahan kembali)]

Karsinogenesis memiliki beberapa tahapan utama, yaitu : 1) Inisiasi ; merupakan tahapan dimana sel normal mengalami kerusakan dan sintesis DNA yang tidak dapat diperbaiki sehingga menghasilkan mutasi sel (sel terinisiasi). Produksi sel terinisiasi dapat terjadi melalui interaksi dengan karsinogen fisik

seperti cahaya UV, radiasi, dan senyawa kimia karsinogen yang memiliki kemampuan merusak DNA atau mutagenik. Kesalahan dalam proses perbaikan DNA yang rusak juga dapat menyebabkan inisiasi sel secara spontan. 2) Promosi ; mencakup modulasi ekspresi gen yang menghasilkan peningkatan jumlah sel melalui pembelahan sel dan atau penurunan dalam kematian sel apoptosis. Senyawa kimia dan senyawa endogenus dapat menyebabkan pertumbuhan sel yang terinisiasi melalui proses promosi tumor. Tahap promosi ini bersifat reversibel. 3) Progesi ; mencakup tambahan kerusakan pada genom dan bersifat irreversibel. Tambahan mutasi dapat terjadi pada sel preneoplasma dan mengakibatkan produksi neoplasma (sel baru) [Klaunig, *et al.*, 2011].

2.3.2 Rokok

Rokok merupakan penyebab kematian di dunia yang paling dihindari saat ini. Rokok diperkirakan telah menyebabkan kematian lebih dari 5 juta orang selama tahun 2008 dan akan bertanggung jawab untuk kematian lebih dari 8 juta orang pada tahun 2030. Sementara banyak negara tengah mengadopsi kebijakan pelarangan penggunaan rokok di tempat umum, masih ada sekitar 1,3 miliar perokok aktif di dunia dan ratusan juta perokok pasif. Merokok tembakau menyebabkan 30% dari total kematian akibat kanker di negara berkembang, dan merokok pasif adalah penyebab penting kejadian kanker, terutama di Asia selatan.

Asap rokok mengandung lebih dari 4.000 senyawa kimia dan beberapa diantaranya bersifat karsinogenik. Karsinogen yang paling kuat yang terdapat dalam asap rokok ialah poliaromatik hidrokarbon (PAH), N-nitrosamin, amina aromatik, aldehid, benzena, dan butadiena. Produk dari asap rokok dapat dibagi menjadi fase partikulat dan fase gas. Fase partikulat terdiri atas nikotin, nitrosamin, *N-nitosonornicotine*, logam, PAH, dan amina karsinogen (4-*aminobiphenyl*). Fase gas mengandung karbon monoksida, karbon dioksida, benzena, amonia, formaldehid, hidrogen sianida, *N-nitrosodimethylamine*, dan *N-nitrosodiethylamine* [Lodovici & Bigagli., 2009].

Paparan terhadap merokok tembakau memiliki hubungan yang kuat dengan kerusakan DNA yang dipicu oleh *oxidative stress* dan karsinogenesis [Patel, *et al.*, 2008]. Merokok tembakau diketahui dapat meningkatkan level

radikal bebas yang memicu pengusakan DNA dan berbagai basa teroksidasi (contoh: 8-oksoGua). Banyak data yang mengindikasikan peranan utama merokok tembakau dalam pertumbuhan kanker pada manusia, seperti paru-paru, mulut, faring, laring, esofagus, kandung kemih, lambung, pankreas, ginjal, uterus, serviks, dan leukimia myeloid [Lodovici & Bigagli., 2009]. Telah diketahui pula bahwa radikal bebas yang dihasilkan selama proses autooksidasi polifenol dalam cairan saliva para pengguna tembakau sangat krusial terhadap tahap inisiasi dan promosi kanker mulut, faring, laring, dan esofagus. Lebih spesifik lagi, merokok tembakau juga dapat : (i) menyebabkan oksidasi dari glutathion (GSH; sebuah antioksidan yang melindungi DNA dari kerusakan akibat ROS), (ii) menurunkan level antioksidan dalam darah, dan (iii) meningkatkan pelepasan radikal superoksida [Ziech, *et al.*, 2011].

2.4 Kanker Payudara

Kanker payudara merupakan jenis kanker yang paling sering terjadi pada wanita dan kejadiannya meningkat sejak tahun 1940 [Jorgensen, *et al.*, 2011]. Dari total kejadian kanker pada wanita, kanker payudara mewakili sekitar 25-29% diantaranya, dan sekitar 15-18% menyebabkan kematian. Penyebab pasti dari kanker payudara masih bersifat spekulatif, namun bukti menunjukkan bahwa xenobiotika memediasi terjadinya modifikasi pada struktur DNA [Musarrat, *et al.*, 1996]. Faktor risiko penyebab terjadinya kanker payudara yang baru diketahui mencakup warisan genetik seperti mutasi gen BRCA-1 dan BRCA-2, paparan terhadap estrogen (menstruasi dini dan keterlambatan menopause meningkatkan risiko), obesitas setelah masa menopause, alkohol, merokok, dan konsumsi tinggi lemak [Jorgensen, *et al.*, 2011], penggunaan kontrasepsi oral secara berlebihan, terapi penggantian hormon, sejarah keluarga, dan tumor jinak payudara [Moradi, *et al.*, 2008]. Beberapa faktor terlihat menurunkan risiko, seperti usia muda saat kelahiran pertama, kehamilan penuh, dan lamanya durasi menyusui. Dengan demikian, risiko kanker payudara diubah oleh gaya hidup dan lingkungan [Jorgensen, *et al.*, 2011].

Kerusakan pada jaringan epitel payudara oleh ROS dapat memicu terjadinya proliferasi fibroblastik, *epithelial hyperplasia*, *cellular atypia*, dan

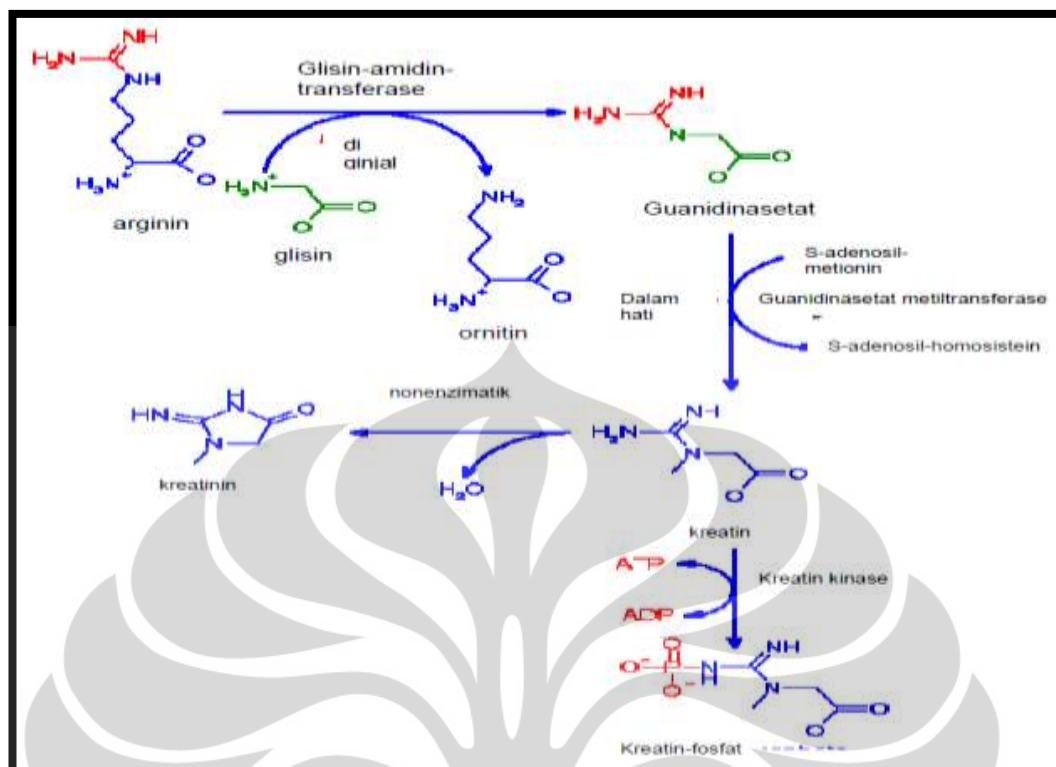
kanker payudara [Kumaraguruparan, *et al.*, 2002]. Biasanya, pasien kanker payudara memiliki peningkatan dalam level tembaga dan besi dalam plasma yang mempengaruhi pembentukan radikal hidroksil. Selain itu, dalam jaringan kanker payudara, aktivitas enzim katalase menurun, sedangkan aktivitas superoksida dismutase dan glutathion peroksidase meningkat. Sejalan dengan hal ini, kelebihan produksi ROS dan penurunan fungsi antioksidan mendukung pembentukan kerusakan oksidatif jaringan pada kanker payudara [Matsui, *et al.*, 2000].

Menurut beberapa penelitian yang dilaporkan oleh Hardman (2001), aktivitas fisik berpengaruh terhadap risiko terjadinya kanker payudara. Wanita dengan aktivitas tinggi (*occupational and recreational*) memiliki risiko yang lebih rendah terhadap kanker payudara daripada wanita yang aktivitasnya sedikit (*recreational alone*).

2.5 Kreatinin

Kreatinin dalam urin berasal dari filtrasi glomerulus dan sekresi oleh tubulus proksimal ginjal. Berat molekul kreatinin relatif kecil sehingga dapat secara bebas masuk dalam filtrat glomerulus. Kreatinin yang diekskresikan dalam urin terutama berasal dari metabolisme kreatin dalam otot dan relatif stabil pada individu sehat [Levey., 2003; Remer *et al.*, 2002; Henry., 2001].

Kreatin terutama ditemukan di jaringan otot (sampai dengan 94%). Kreatin otot diambil oleh darah karena otot sendiri tidak mampu mensintesis kreatin. Kreatin darah berasal dari makanan dan biosintesis yang melibatkan berbagai organ terutama hati. Proses awal biosintesis kreatin berlangsung di ginjal yang melibatkan asam amino arginin dan glisin. Menurut salah satu penelitian *in vitro*, kreatin secara hampir konstan akan diubah menjadi kreatinin dalam jumlah 1,1% per hari. Kreatinin yang terbentuk ini kemudian akan berdifusi keluar sel otot untuk kemudian diekskresi dalam urin. Pembentukan kreatinin dari kreatin berlangsung secara konstan dan tidak ada mekanisme *reuptake* oleh tubuh, sehingga sebagian besar kreatinin yang terbentuk dari otot diekskresi lewat ginjal. Dengan demikian, ekskresi kreatinin dapat digunakan untuk menggambarkan filtrasi glomerulus.



Gambar 2.12 Mekanisme Pembentukan Kreatinin

[Sumber : "creatine synthesis" <http://www.med.unibs.it/aminoacidderivatives.html>]

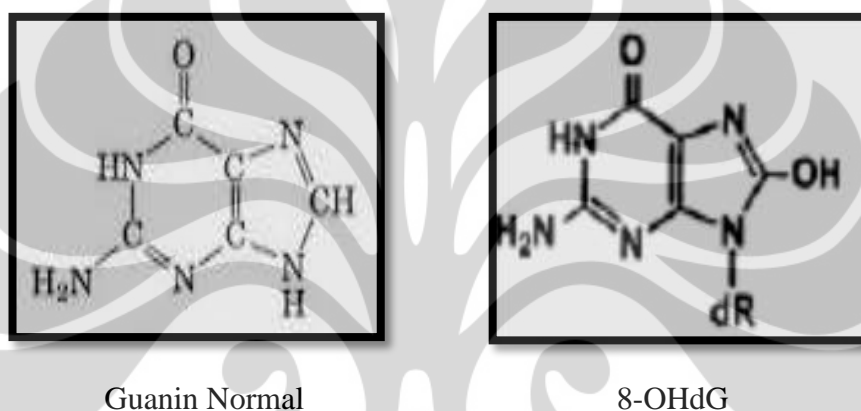
Jumlah kreatinin yang dikeluarkan seseorang setiap hari lebih bergantung pada massa otot total daripada aktivitas otot atau tingkat metabolisme protein, walaupun keduanya juga menimbulkan efek. Pria memiliki kadar kreatinin yang lebih tinggi daripada wanita karena massa ototnya lebih besar. Pembentukan kreatinin harian umumnya tetap, kecuali jika terjadi cedera fisik yang berat atau penyakit degeneratif yang menyebabkan kerusakan masif pada otot. Menurut WHO, range normal kreatinin pada manusia adalah 0,3 – 3,0 g/L.

2.6 DNA Adduct sebagai Biomarker Risiko Kanker

Berdasarkan penelitian *Biological markers in environmental health research* dalam Lodovici & Bigagli (2009), biomarker molekular merupakan indikator terhadap efek atau kerentanan terhadap paparan. Biomarker paparan mengindikasikan adanya paparan terhadap agen lingkungan, sedangkan biomarker efek menunjukkan adanya respon biologis terhadap paparan pada sebuah agen

lingkungan. Lebih lanjut, biomarker memiliki potensi besar dalam mengklarifikasi hubungan antara agen lingkungan dan suatu penyakit.

Salah satu kemungkinan biomarker bagi risiko kanker ialah pengukuran karsinogen-DNA *adduct*, yang merupakan produk langsung atau penanda kerusakan makromolekul target. Pengukuran DNA *adduct* mencakup pengukuran asupan karsinogen, aktivitas metabolisme, dan pelepasan ke makromolekul target di dalam jaringan (dosis efektif biologis) [Lodovici & Bigagli., 2009]. Contoh struktur basa DNA normal dan basa DNA termodifikasi (DNA *adduct*) :



Gambar 2.13 Struktur Basa Guanin Normal dan Basa Guanin Termodifikasi (8-OHdG)

[Sumber : <https://www.google.co.id/search?q=gambar+struktur+basa+DNA&ie=utf-8&oe=utf-8&aq=t&rls=org.mozilla:en-US:official&client=firefox-a>]

Sebagai contoh, senyawa 8-OHdG telah dijadikan sebagai salah satu biomarker kerusakan oksidatif DNA. Senyawa ini dapat diidentifikasi menggunakan teknik HPLC-MS dan ELISA [Halliwell & Whiteman., 2004], HPLC-ECD [Kuo, et al,2003], serta SPE-HPLC-ECD [Kuo, *et al.*, 2003]. Asami, *et al* (1997) menggunakan 8-OHdG sebagai biomarker terhadap paparan rokok pada kasus kanker, perokok sehat, dan non-perokok. Ditemukan bahwa kadar 8-OHdG dalam paru-paru perokok lebih tinggi daripada non-perokok.

2.7 Identifikasi 8-Hidroksi-2'-Deoksiguanosin (8-OHdG) pada Urin

Pembentukan senyawa 8-hidroksi-2'-deoksiguanosin (8-OHdG, 7,8-dihidro-8-okso-2'-deoksiguanosin) sebagai bentuk utama kerusakan oksidatif

DNA dilaporkan pertama kali oleh Kasai dan Nishimura pada tahun 1984. Merupakan hal yang sulit untuk mengisolasi senyawa mutagen karena aktivitas mutagenik tidak terlalu tinggi dan senyawa mutagen tersebut tidak cukup stabil. Untuk itu, dikembangkan suatu metode untuk menangkap senyawa mutagen yang reaktif tersebut dalam bentuk derivat guanin, karena berdasarkan fakta bahwa banyak senyawa mutagen dan karsinogen bereaksi dengan basa dari asam nukleat, terutama dengan guanin.

Level 8-OHdG telah dianalisis di dalam organ, leukosit DNA, dan urin manusia. Dalam sampel liver manusia yang menderita hepatitis kronis dideteksi 8-OHdG dengan kadar yang tinggi. Hal ini menggambarkan bahwa radikal oksigen terlibat dalam hepatokarsinogenesis pada manusia. 8-OHdG dengan level tinggi juga terdeteksi pada bagian periferal paru-paru dari pasien kanker paru-paru dibandingkan dengan kontrol non kanker ; berarti radikal oksigen juga terlibat dalam induksi kanker paru-paru. Penting untuk disebutkan bahwa banyak proses transversi GC→TA yang diinduksi oleh 8-OHdG telah terdeteksi dalam gen p53 yang diisolasi dari kanker paru-paru dan liver pada manusia. Kadar 8-OHdG pada urin perokok dideteksi 50% lebih tinggi daripada non perokok. Kadar yang lebih tinggi juga ditemukan pada wanita dibandingkan pada pria, dan pada orang gemuk dibandingkan pada orang kurus. Suzuki et al. juga melaporkan bahwa kadar 8-OHdG pada urin manusia meningkat setelah menghirup gas buangan kendaraan bermotor [Kasai., 1997].

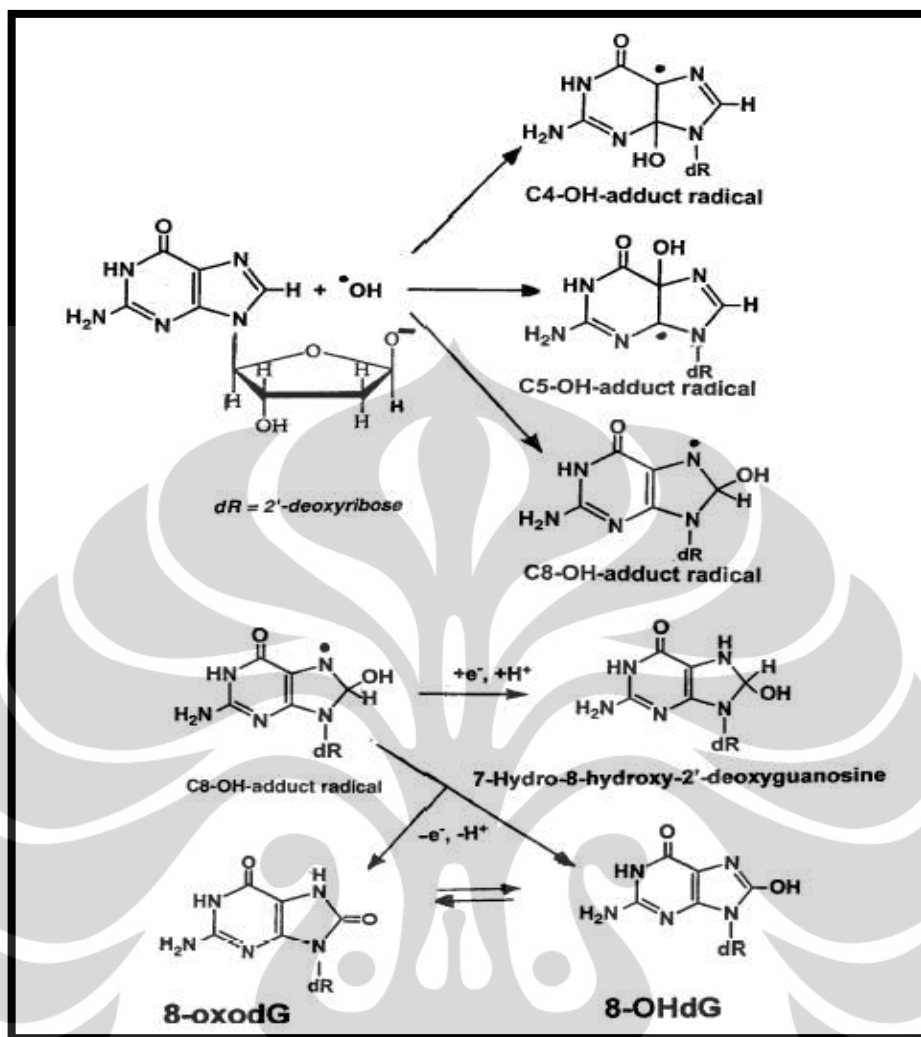
Ukuran 8-OHdG dalam urin telah digunakan untuk menilai tingkat kerusakan oksidatif DNA pada keseluruhan tubuh [Halliwell & Whiteman., 2004]. Banyak faktor yang dapat mempengaruhi 8-OHdG, di antaranya spesies hewan, jenis kelamin, usia, latihan fisik, alkohol, rokok, berat badan, dan nutrisi. Faktor-faktor ini dapat mengganggu pengukuran 8-OHdG dalam urin [Kuo, *et al.*, 2003]. Meskipun demikian, pengukuran 8-OHdG tetap dianggap sebagai cara terbaik untuk melihat tingkat kerusakan oksidatif DNA melalui urin [Halliwell & Whiteman., 2004] karena telah dikembangkan berbagai metode pengukuran senyawa ini.

Setidaknya, 24 modifikasi basa terkait dengan serangan ROS telah teridentifikasi. Di antara basa-basa termodifikasi ini, 8-hidroksi-2'deoksiguanosin

adalah *adduct* yang paling dominan. 8-OHdG terbentuk melalui oksidasi basa guanin pada posisi C-8. DNA *adduct* ini terdeteksi dalam berbagai jaringan dan urin, serta merupakan biomarker yang paling banyak digunakan untuk kerusakan oksidatif DNA, baik secara *in vivo* maupun *in vitro*. Berbagai agen lingkungan dilaporkan dapat memicu kenaikan level 8-OHdG, termasuk radiasi ionisasi; merokok tembakau; logam seperti arsen, besi, dan kadmium; dan senyawa organik seperti tetraklorida dan kloroform. Kenaikan level 8-OHdG telah terdeteksi dalam beberapa kondisi penyakit, seperti diabetes, Parkinson, Alzheimer, dan infeksi hepatitis C kronis [Klaunig, *et al.*, 2011].

Interaksi antara radikal hidroksil dengan basa pada untai DNA, seperti guanin, menyebabkan pembentukan C8-hidroksiguanin (8-OHGua) atau bentuk nukleosidanya (8-hidroksi-2'-deoksiguanosin). Mulanya, reaksi radikal hidroksil memicu pembentukan *adduct* radikal, kemudian oleh pengurangan satu elektron, terbentuklah 8-OHdG. 8-OHdG mengalami tautomerisasi keto-enol, membentuk 8-okso-7,8-dihidro-2'-deoksiguanosin (8-oksodG) [Valavanidis, *et al.*, 2009]. Mekanisme pembentukan 8-OHdG dapat dilihat pada Gambar 2.14.

Analisis 8-OHdG di dalam urin telah ditetapkan sebagai sebuah biomarker yang penting untuk mengevaluasi *oxidative stress* dan menilai risiko kanker setelah terpapar berbagai senyawa karsinogen, polutan lingkungan, dan faktor gaya hidup.



Gambar 2.14 Mekanisme Pembentukan 8-OHdG

[Sumber : Valavanidis, *et al.*, 2009]

Merokok tembakau telah dikenal dengan sifat oksidatif dan potensi karsinogeniknya. Kenaikan level 8-OHdG ditemukan dalam jaringan manusia, termasuk paru-paru dan leukosit perifer pada perokok. Selain itu, peningkatan level 8-OHdG juga ditemukan pada perokok pasif di tempat kerja yang terpapar asap rokok [Valavanidis., 2009]. Ekskresi produk kerusakan DNA dalam urin terbukti menjadi sebuah biomarker penting terhadap risiko kanker.

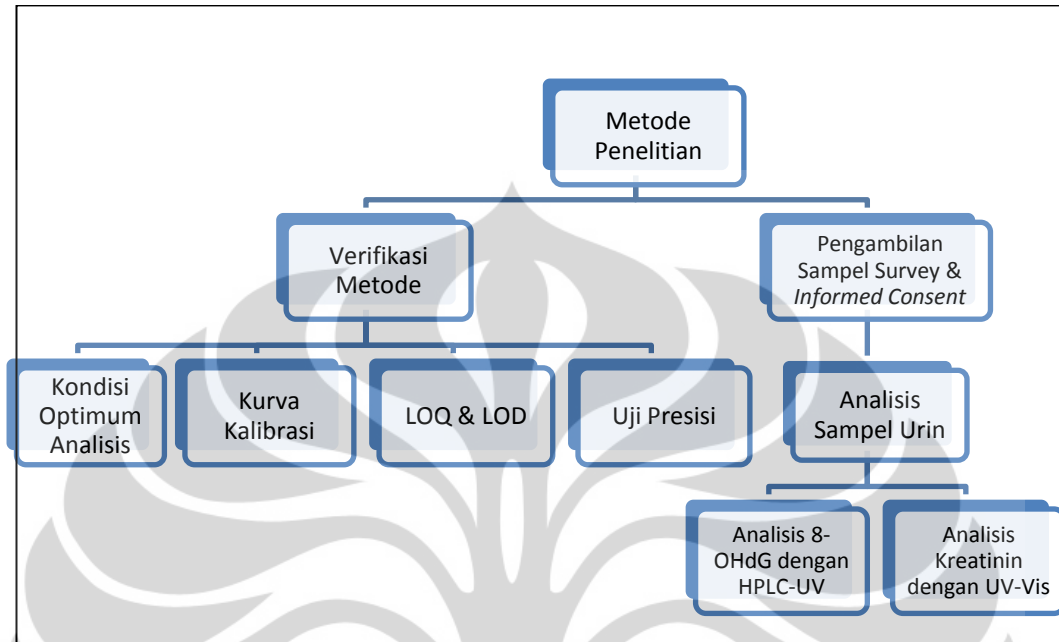
Konsep bahwa kenaikan level 8-OHdG *adduct* dalam DNA memegang peranan penting dalam karsinogenesis dan promosi sel tumor, terutama kanker payudara pada manusia telah diterima secara luas [Musarrat, *et al.*, 1996].

Penelitian yang dilakukan oleh Matsui, *et al* (2000) menggunakan metode HPLC-ECD menunjukkan bahwa jaringan kanker payudara mengandung level 8-OHdG yang secara signifikan lebih tinggi daripada jaringan non kanker payudara. Penemuan ini mendukung asumsi bahwa sel kanker lebih terpapar pada *oxidative stress* daripada jaringan non kanker. Penelitian lain yang dilakukan oleh Malins, *et al* (1993) menggunakan metode GC-MS dan Musarrat, *et al* (1996) dengan menggunakan *solid-phase immunoslot blot assay* juga menunjukkan hasil yang sama. Penelitian Musarrat *et al* memberikan bukti yang kuat dan dapat diterima bahwa terdapat perbedaan yang sangat signifikan antara profil basa yang teroksidasi antara jaringan normal, tumor jinak, dan tumor ganas payudara. Level 8-OHdG dalam jaringan tumor ganas 9,76 kali lebih tinggi dibandingkan dengan jaringan normal payudara [Musarrat, *et al.*, 1996].

Dari hasil penelitian Matsui, *et al* diperoleh korelasi negatif antara stadium kanker dengan level 8-OHdG dalam DNA kanker payudara. Tingginya level 8-OHdG yang terdeteksi pada jaringan kanker dengan stadium awal menggambarkan bahwa radikal oksigen berperan dalam fase awal proses karsinogenesis, sedangkan pada fase progresi dan metastatis tidak terlihat efek tingginya level 8-OHdG. Hal ini bisa terjadi kemungkinan karena adanya peningkatan kinerja enzim dalam perbaikan DNA pada jaringan kanker payudara stadium lanjut. Sementara itu, pada jaringan non kanker payudara, ditemukan bahwa level 8-OHdG tidak berkaitan dengan usia pasien. Padahal, secara umum, 8-OHdG dianggap sebagai indikator penuaan (*aging*) [Matsui, *et al.*, 2000] dan usia individu dikenali sebagai faktor risiko utama dalam pertumbuhan kanker payudara.

Korelasi antara tingkat kerusakan oksidatif DNA (rasio antara laju kerusakan DNA oleh senyawa endogenus dengan laju perbaikan DNA) dengan frekuensi terjadinya mutasi dan kejadian kanker tergantung pada ketersediaan metode yang sensitif untuk analisis kerusakan DNA pada level rendah. Karena 8-OHdG merupakan biomarker yang paling sering digunakan untuk menentukan kerusakan DNA, maka kuantifikasinya pada level rendah menjadi sangat penting untuk menguji hubungan korelasinya [Valavanidis., 2009].

BAB 3 METODE PENELITIAN



Bagan 3 Skema Umum Penelitian

3.1 Lokasi Penelitian

Pengambilan sampel urin pasien penderita kanker yang dilakukan di sebuah Klinik Onkologi di Bandung, sedangkan sampel urin perokok dan non perokok (kontrol) dilakukan di wilayah sekitar Depok. Penelitian dan pengukuran 8-OHdG dilakukan di laboratorium penelitian biokimia dan instrumen Departemen Kimia FMIPA Universitas Indonesia.

3.2 Alat dan Bahan

3.2.1 Alat

Peralatan laboratorium yang digunakan adalah *High Pressure Liquid Chromatography* (HPLC) dengan detektor UV-Visible, spektrofotometer UV-Visible (UV-Vis), sentrifugator, *cooler box*, peralatan gelas, pipet mikro, timbangan, pH meter, pompa vakum, syringe 3 mL sekali pakai, filter Puridis 0,45 μm , dan filter Cellulose.

3.2.2 Bahan Kimia

8-hidroksi-2'-deoksiganosin (8-OHdG) diperoleh dari Sigma Co. Ltd, kreatinin, metanol untuk HPLC diperoleh dari Merck, asam pikrat jenuh, natrium fosfat, natrium asetat, akuabides, asam sulfat, asam klorida, natrium hidroksida.

3.2.3 Bahan Biologi

Sampel dalam penelitian ini dibatasi hanya pada :

- a. Sampel urin penderita kanker, yaitu sukarelawan penderita kanker yang datang berobat ke Klinik Onkologi di Bandung sebanyak 9 orang.
- b. Sampel urin perokok, yaitu pria yang berusia antara 20-40 tahun, merokok dengan jenis rokok filter dan paling sedikit 12 batang per hari sebanyak 18 orang.
- c. Sampel urin kontrol, yaitu wanita dan pria yang berusia antara 20-40 tahun, sehat, dan tidak merokok dengan jumlah masing-masing 10 dan 22 orang.

3.3 Metode Kerja

3.3.1 Pengambilan Sampel Urin

Pengambilan sampel urin dilakukan selama bulan Maret – Mei 2012. Sampel yang diambil terdiri dari tiga kelompok, yaitu kelompok kanker, perokok aktif, dan non perokok (kontrol). Untuk kelompok perokok dan non perokok (kontrol), pengambilan sampel dilakukan secara acak sederhana (*simple random sampling*). Prinsip dari teknik ini adalah bahwa setiap anggota atau unit dari populasi memiliki kesempatan yang sama untuk dipilih sebagai sampel karena dianggap mengalami paparan yang sama [Notoatmodjo, 2005].

Sampel kontrol yang diambil harus memenuhi beberapa kriteria, yaitu wanita dan pria yang berusia antara 20-40 tahun, sehat, tidak merokok dan tidak pernah / jarang terpapar asap rokok. Untuk sampel perokok aktif ialah pria yang berusia antara 20-40 tahun dan merokok paling sedikit 12 batang rokok per hari.

Sementara itu, untuk pengambilan sampel penderita kanker dilakukan secara *accidental* dengan mengambil kasus atau responden yang kebetulan ada atau tersedia [Notoatmodjo, 2005]. Sampel yang diambil adalah sukarelawan

pasien kanker payudara yang datang berobat di sebuah Klinik Onkologi di Bandung.

Pengambilan sampel urin didahului dengan pemberian *informed consent* kepada individu yang akan dijadikan sampel untuk meminta persetujuannya ikut serta dalam penelitian ini. Guna mengetahui latar belakang serta faktor-faktor yang terkait pada individu, dilakukan survei dengan pemberian kuisioner yang berisi beberapa pertanyaan penting, seperti data pribadi, status kesehatan, kebiasaan hidup, status pekerjaan, dan riwayat kesehatan. Sampel urin yang diambil dengan jenis *spot urine specimens*, untuk sementara waktu disimpan di dalam *cooler box* dengan temperatur 4°C dan selanjutnya disimpan pada temperatur -20°C hingga saat dilakukan analisis. Hal ini dilakukan sebagai langkah pengawetan sampel, sehingga tidak perlu dilakukan penambahan suatu senyawa kimia karena dikhawatirkan dapat mengganggu kestabilan sampel.

3.3.2 Preparasi Reagen

3.3.2.1 Pembuatan Larutan Penyangga Natrium Fosfat 10 mmol/L pH 6,7

Untuk setiap 500 mL larutan penyangga natrium fosfat 10 mmol/L pH 6,7, sebanyak 0,71 g garam natrium fosfat (Na_2HPO_4) dilarutkan dengan 100 mL akuabides. Keasamannya diatur hingga 6,7 dengan penambahan larutan HCl 1 M. Kemudian larutan ditambahkan akuabides hingga volume 500 mL. Larutan disimpan pada suhu 4°C.

3.3.2.2 Pembuatan Larutan Natrium Asetat 130 mmol/L pH 4,5

Untuk setiap 100 mL larutan natrium asetat 130 mmol/L pH 4,5, sebanyak 1,07 g garam natrium asetat dilarutkan dengan 50 mL akuabides. Keasamannya diatur hingga 4,5 dengan penambahan larutan HCl 1 M. Ke dalam larutan kemudian ditambahkan 0,06 mL H_2SO_4 dan akuabides hingga volume 100 mL.

3.3.3 Verifikasi Metode

3.3.3.1 Pembuatan Larutan Stok 8-Hidroksi-2'-Deoksiganosin

Larutan stok 8-OHdG 8 ppm dibuat dengan mengencerkan larutan stok 8-OHdG 500 ppm sebanyak 160 μL ke dalam labu ukur 10 mL. Larutan stok ini disimpan pada temperatur 4°C.

3.3.3.2 Pembuatan Larutan Standar 8-Hidroksi-2'-Deoksiganosin

Larutan standar 8-OHdG dibuat dalam variasi konsentrasi, yaitu 4000, 2000, 1000, 800, 600, 400, 200, dan 100 ppb melalui pengenceran larutan stok 8 ppm dengan akuabides dan penambahan larutan natrium asetat 130 mmol/L pH 4,5 pada perbandingan 1:1.

3.3.3.3 Kondisi Optimum HPLC

Kondisi optimum HPLC untuk pengukuran senyawa 8-OHdG dalam larutan standar dan larutan sampel ditentukan dengan menyuntikkan salah satu larutan standar dengan konsentrasi tertentu sebanyak 20 μL ke dalam kolom HPLC pada variasi komposisi fasa gerak metanol-buffer natrium fosfat 10 mmol/L pH 6,7, yaitu (5:95), (10:90), (20:80), dan (30:70) dengan laju alir 1 mL/ menit pada kolom HPLC. Analisis dilakukan selama 10-20 menit.

3.3.3.4 Kurva Kalibrasi

Setelah diperoleh kondisi optimum HPLC, sebanyak 20 μL masing-masing larutan standar 8-OHdG dengan range konsentrasi 100-1000 ppb disuntikkan ke dalam kolom HPLC. Kemudian dibuat kurva kalibrasi antara luas area puncak yang diperoleh terhadap konsentrasi larutan standar.

3.3.3.5 Pengujian Batas Deteksi (LOD) dan Batas Kuantifikasi (LOQ)

Pengujian batas deteksi (LOD) dan batas kuantifikasi (LOQ) dilakukan dengan perhitungan secara statistik melalui regresi linear kurva kalibrasi. Nilai pengukuran akan sama dengan nilai b pada garis linear $y = a + bx$, sedangkan simpangan baku blanko sama dengan simpangan baku residual ($S(y/x)$).

3.3.3.6 Uji Keterulangan (Presisi)

Uji keterulangan (presisi) dilakukan dengan pengukuran larutan standar 8-OHdG pada konsentrasi 1000, 2000, dan 4000 ppb diulang sebanyak 6 kali pada kondisi optimum kolom HPLC. Keterulangan dihitung dengan membandingkan luas puncak antara pengukuran sebanyak 6 kali dan luas puncak kurva kalibrasi sehingga menghasilkan nilai standar deviasi (SD) dan persentase koefisien variasi (%KV).

3.3.4 Analisa 8-Hidroksi-2'-Deoksiguanosin pada Sampel Urin

Sampel urin yang disimpan pada suhu -20°C dikeluarkan dari lemari pendingin untuk dibiarkan mencair pada temperatur ruang. Selama analisis berlangsung, sampel urin disimpan kembali di dalam lemari pendingin yang bertemperatur 4°C . Kemudian, 0,5 mL sampel urin dicampurkan dengan 0,5 mL larutan natrium asetat 130 mmol/L pH 4,5 yang sebelumnya telah ditambahkan dengan 0,6 mmol/L larutan H_2SO_4 . Sampel urin ini didiamkan selama 2 jam pada temperatur 4°C . Selanjutnya dilakukan sentrifugasi pada 3.000 rpm selama 5 menit. Aliquot sebanyak 20 μL diambil dari supernatan sampel urin dan diinjeksikan ke kolom HPLC yang menggunakan detektor UV pada panjang gelombang 254 nm. Fasa gerak (eluen) yang digunakan adalah metanol dan larutan penyangga natrium fosfat 10 mmol/L pH 6,7 dengan laju alir 1 mL/menit. Hasil pengukuran sampel urin kemudian dibandingkan dengan kurva kalibrasi standar 8-OHdG. Kuantifikasi 8-OHdG pada sampel dilakukan dengan mengukur luas puncak sampel berdasarkan plot kalibrasi dari luas puncak standar 8-OHdG pada berbagai konsentrasi.

3.3.5 Analisis Jumlah Kreatinin

Analisis jumlah kreatinin pada sampel urin dilakukan dengan metode *de Jaffe*, yaitu berdasarkan perubahan warna kompleks kreatinin-pikrat. Analisis ini dilakukan untuk membandingkan berat 8-OHdG terhadap berat kreatinin karena ekskresi kreatinin pada urin cenderung konstan. Konsentrasi kreatinin yang digunakan sebagai batas normal yang diizinkan WHO adalah 0,3 – 3 g/L. Batas

normal digunakan sebagai gambaran fungsi ginjal yang normal sehingga mengindikasikan bahwa objek penelitian berada dalam keadaan sehat.

3.3.5.1 Pembuatan Larutan Stok Kreatinin

Larutan stok kreatinin 12 g/L dibuat dengan melarutkan 0,3 g serbuk kreatinin dalam HCl 0,1 M pada labu ukur 25 mL. Larutan stok disimpan pada temperatur 4°C.

3.3.5.2 Analisa Kreatinin Pada Sampel Urin

Pembuatan kurva standar dilakukan dengan variasi konsentrasi larutan standar kreatinin, yaitu 120, 480, 1200, dan 4800 mg/L. Deret konsentrasi ini dibuat dengan pengenceran larutan stok kreatinin.

Kemudian sampel urin disentrifugasi untuk memisahkan sedimennya. Setiap 0,1 mL sampel urin ditambahkan 1 mL larutan NaOH 1 M dan 0,5 mL asam pikrat jenuh. Setelah didiamkan selama 10 menit, sampel urin diencerkan dalam labu ukur 25 mL dan dikocok hingga homogen. Pengukuran sampel urin harus dilakukan segera dengan menggunakan Spektrofotometer UV-Visible pada panjang gelombang 485 nm.

3.3.6 Uji Statistik

3.3.6.1 Uji Statistik T Independen (*Independent Sample T Test*)

Independent Sample T Test ini digunakan untuk mengetahui ada tidaknya perbedaan rerata (*mean*) antara dua populasi dengan melihat rerata dua sampelnya. Uji t dua sampel dilakukan dalam dua tahapan; tahapan pertama adalah menguji apakah varians dari dua populasi bisa dianggap sama. Setelah itu, baru dilakukan pengujian untuk melihat ada tidaknya perbedaan rerata populasi. Pada dasarnya, uji t mensyaratkan adanya kesamaan varians dari dua populasi yang diuji.

3.3.6.2 Uji Statistik *One Way ANOVA*

Untuk melihat adanya perbedaan yang signifikan antara rerata hitung lebih dari dua kelompok sampel, maka dilakukan analisis data lebih lanjut dengan

menggunakan uji *one way ANOVA (Analysis of Variance)*. Selain itu, uji ini juga dapat digunakan untuk mengetahui variabel mana saja yang berbeda dengan yang lainnya. Pada uji *one way ANOVA* digunakan asumsi bahwa populasi yang akan diuji berdistribusi normal, varians dari populasi tersebut adalah sama, dan sampel tidak berhubungan satu dengan yang lain.



BAB 4

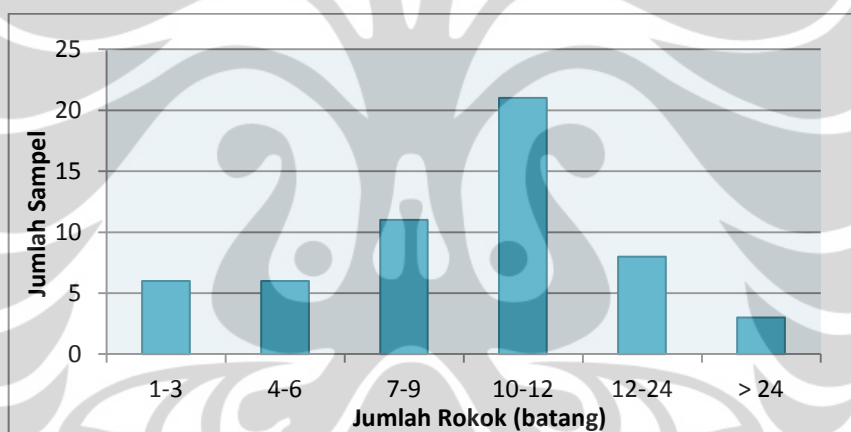
HASIL DAN PEMBAHASAN

4.1 Deskripsi Sampel

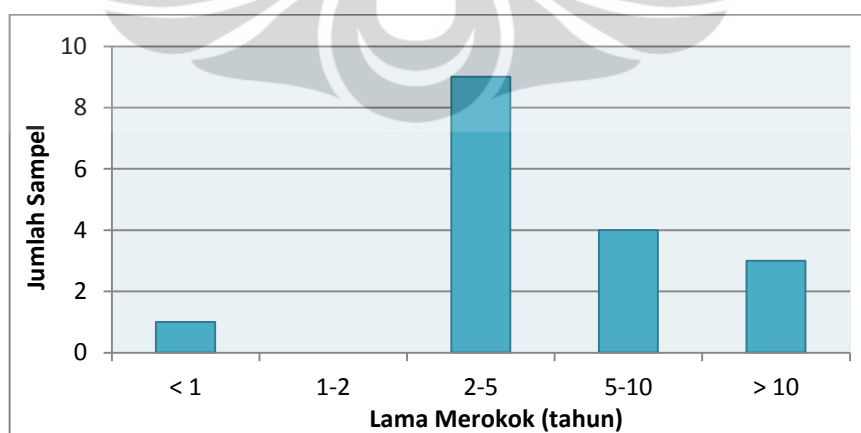
Kurangnya informasi dan metode untuk mendeteksi risiko kanker secara dini menjadi salah satu penyebab tingginya angka kejadian dan kematian akibat kanker di dunia saat ini. Karena alasan tersebut, para ilmuwan tengah berupaya mengembangkan berbagai metode untuk deteksi dini kanker, salah satunya dengan mendeteksi biomarker kerusakan DNA (genotoksik) berupa DNA *adduct* yang diketahui sebagai salah satu faktor utama penyebab terjadinya kanker. DNA *adduct* merupakan modifikasi pada basa DNA akibat paparan senyawa xenobiotika berupa radikal bebas (*oxidative stress*) yang dapat bersumber dari hasil reaksi metabolisme normal tubuh (endogenus) maupun dari lingkungan (eksogenus), seperti aktivitas merokok, alkohol, diet, infeksi, obesitas, dan lain-lain. Salah satu faktor lingkungan yang sangat berpengaruh dalam pembentukan ROS adalah senyawa kimia yang terkandung dalam rokok. Oleh karena itu, dalam penelitian ini diambil tiga kelompok sampel, yaitu sampel penderita kanker, sampel perokok, dan sampel kontrol. Masing-masing kelompok sampel dilihat tingkat kerusakan DNANYa melalui deteksi 8-OHdG sebagai biomarker dan kemudian dibandingkan satu sama lain.

Dari 12 orang sukarelawan penderita kanker yang bersedia diambil urinnya, sebanyak sembilan orang wanita penderita kanker payudara terpilih untuk dijadikan sampel, sedangkan tiga orang lainnya tidak dapat digunakan karena menderita jenis kanker lainnya, yaitu paru-paru, ginjal, dan kulit (tidak homogen). Semua sampel penderita kanker ini merupakan pasien yang datang berobat ke salah satu Klinik Onkologi di Bandung Jawa Barat. Pasien berusia antara 33-62 tahun dan sedang menderita kanker payudara pada stadium II ke atas. Berdasarkan hasil wawancara dan lembar kuisioner, seluruh pasien menyatakan diri bukan perokok dan berasal dari keluarga kalangan menengah ke bawah dengan pekerjaan umumnya ialah ibu rumah tangga. Pengambilan sampel penderita kanker ini dilakukan secara *accidental*, yaitu sesuai dengan ketersediaan dan kerelaan sampel di lapangan.

Selain itu, dilakukan pengambilan sampel pembandingan, yaitu kelompok perokok aktif. Namun dikarenakan sulitnya memperoleh sampel perokok dari kelompok wanita, maka dengan segala keterbatasan pada tahap penelitian ini, dilakukan pengambilan sampel perokok aktif kelompok pria dengan usia antara 20-40 tahun, merokok dengan jenis rokok filter dan minimal 12 batang per hari. Pemilihan jenis rokok (filter atau non filter) ini dilakukan berdasarkan data di lapangan bahwa semua responden yang bersedia dimintai sampel urinnya adalah perokok dengan jenis rokok filter. Demikian juga dengan pemilihan jumlah rokok yang dihisap per hari. Berdasarkan hasil kuisioner kepada seluruh responden, ternyata mayoritas responden merokok dengan jumlah paling sedikit 12 batang rokok per hari (Gambar 4.1) dan mayoritas telah merokok lebih dari dua tahun lamanya (Gambar 4.2).



Gambar 4.1 Jumlah Rokok yang Dihisap per Hari



Gambar 4.2 Lama Merokok

Sebagai kontrol, diambil sampel yang terdiri dari kontrol wanita dan kontrol pria. Untuk sampel kontrol wanita, diperoleh 10 orang mahasiswa Universitas Indonesia yang berusia antara 20-25 tahun, sedangkan untuk sampel kontrol pria, adalah 22 orang pria yang berusia 20-40 tahun. Semua sampel kelompok kontrol ini tidak memiliki riwayat kesehatan yang buruk, sehat, dan tidak memiliki aktivitas merokok (bukan perokok dan jarang / tidak pernah terpapar asap rokok. Pengambilan sampel kelompok perokok dan kelompok kontrol dilakukan secara acak (*random sampling*).

Tabel 4.1 Kriteria Sampel yang Dipilih

	Sampel Kanker	Sampel Perokok	Sampel Kontrol Pria	Sampel Kontrol Wanita
Jenis Kelamin	Wanita	Pria	Pria	Wanita
Usia	33-62 tahun	20-40 tahun	20-40 tahun	20-25 tahun
Aktivitas Merokok	Tidak merokok	Merokok	Tidak Merokok	Tidak Merokok
Jumlah Sampel	9	18	22	10

Semua data sampel terkait riwayat kesehatan, riwayat pekerjaan, dan kebiasaan sehari-hari seperti aktivitas merokok dicatat melalui kuisisioner. Sebelum proses pengambilan sampel urin dilakukan, seluruh responden diberikan *informed consent* untuk meminta persetujuan individu tersebut untuk ikut serta dalam penelitian ini tanpa adanya paksaan. Dalam *informed consent* dijelaskan mengenai latar belakang dan tujuan dilakukannya penelitian ini, sehingga responden dapat mengetahui dan memahami penelitian ini secara umum.

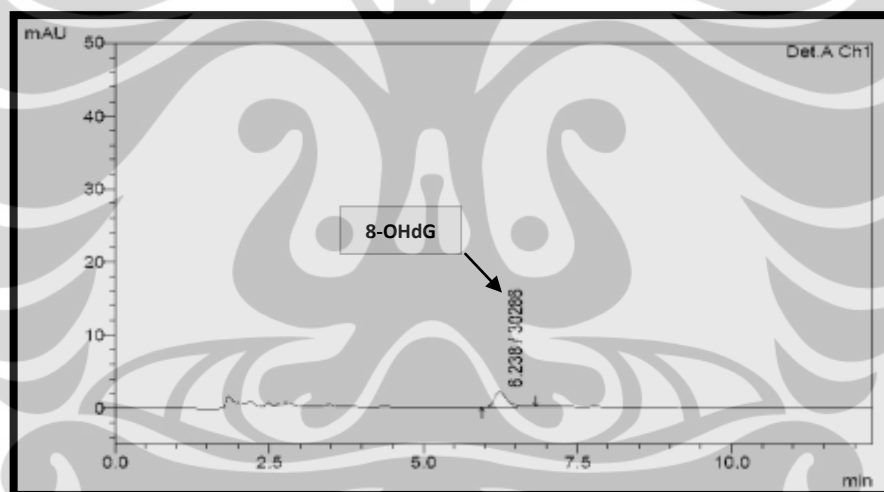
4.2 Verifikasi Metode Analisis 8-OHdG

4.2.1 Kondisi Optimum Analisis

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

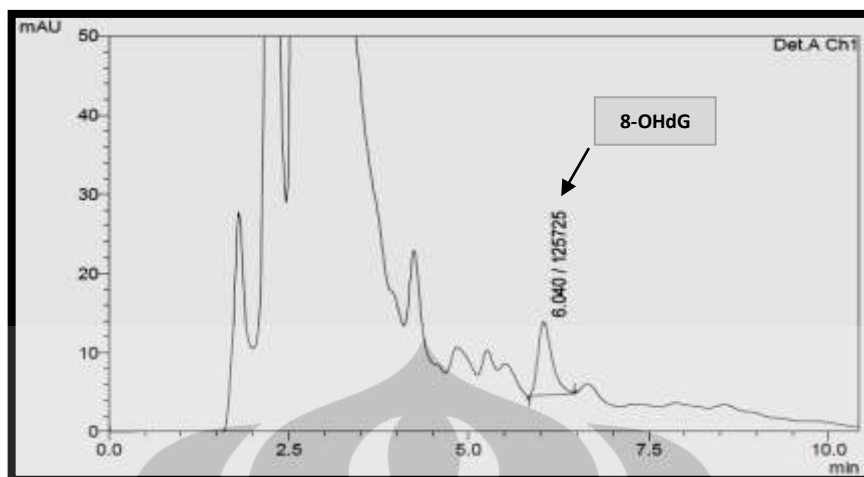
Instrumentasi	: HPLC, Shimadzu LC-20AB
Kolom	: LichroCART®(MERCK) RP-18; 5 µm; 4,6 x 250 mm
Detektor	: UV-Vis, Shimadzu SPD-20A
Panjang gelombang	: 254 nm
Fasa gerak	: Metanol : Buffer Fosfat 10 mmol/L pH 6,7 (20:80)
Laju alir	: 1 mL/menit
Volume injeksi	: 20 µL

Kromatogram larutan standar 8-OHdG dapat dilihat pada Gambar 4.3 dan kromatogram sampel urin dapat dilihat pada Gambar 4.4.



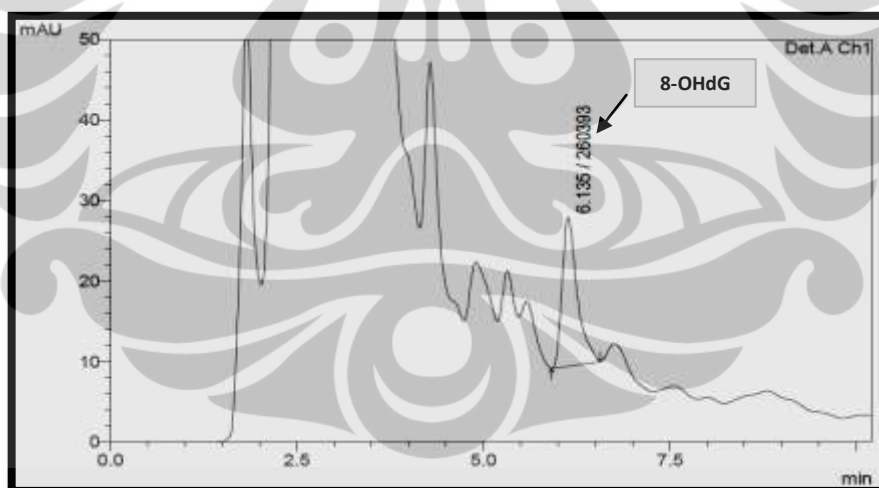
Gambar 4.3 Kromatogram Larutan Standar 8-OHdG 800 ppb

Pada Gambar 4.1 diperlihatkan bahwa puncak senyawa 8-OHdG dalam larutan standar dengan konsentrasi 800 ppb terdeteksi muncul pada waktu retensi sekitar menit keenam ($t_R = 6$).



Gambar 4.4 Kromatogram Sampel Urin

Gambar 4.4 merupakan kromatogram profil salah satu sampel urin yang diduga mengandung 8-OHdG. Puncak kromatogram yang diduga merupakan puncak senyawa 8-OHdG ini muncul di waktu retensi yang sama dengan waktu retensi munculnya senyawa 8-OHdG pada kromatogram larutan standar (Gambar 4.3).



Gambar 4.5 Kromatogram Sampel Urin dengan Penambahan Larutan Standar 8-OHdG (*spike*) 800 ppb (1:1)

Untuk memastikan waktu retensi (t_R) puncak senyawa 8-OHdG di dalam sampel urin pada Gambar 4.4, dilakukan penambahan standar 8-OHdG (*spike*) 800 ppb ke dalam sampel dengan perbandingan 1:1. Adanya peningkatan

intensitas dan luas area puncak pada waktu retensi tertentu ($t_R = 6,15$) setelah penambahan standar 8-OHdG ke dalam sampel (*spike*), memastikan bahwa posisi tersebut merupakan posisi atau waktu retensi puncak senyawa 8-OHdG dalam sampel urin. Hal ini dapat dilihat pada Gambar 4.5. Data kondisi optimum analisis pengukuran standar 8-OHdG terdapat pada Lampiran 2.

4.2.2 Kurva Kalibrasi 8-OHdG

Untuk kurva kalibrasi larutan standar 8-OHdG, diperoleh :

Persamaan garis : $y = 48,66x + 8488,2$

Koefisien korelasi (R^2) : 0,997

Data selengkapnya dapat dilihat pada Lampiran 2.

4.2.3 Batas Deteksi (LOD) dan Batas Kuantifikasi (LOQ)

Batas deteksi (LOD) 8-OHdG pada kondisi optimum analisis menggunakan HPLC-UV adalah sebesar 62,586 $\mu\text{g/L}$, sedangkan batas kuantifikasinya (LOQ) sebesar 208,619 $\mu\text{g/L}$. Hal ini menunjukkan bahwa alat HPLC-UV dapat mendeteksi senyawa 8-OHdG sampai batas 62,586 $\mu\text{g/L}$ dengan kuantifikasi sampai 208,619 $\mu\text{g/L}$. Perhitungan LOD dan LOQ dapat dilihat pada Lampiran 2.

4.2.4 Uji Keterulangan (Presisi)

Hasil uji keterulangan pada tiga konsentrasi larutan standar 8-OHdG yang diuji pada percobaan ini memberikan nilai koefisien variasi 2,628%, 1,628%, dan 1,229%. Data selengkapnya dapat dilihat pada Lampiran 2.

4.3 Hasil Pengukuran Kadar 8-OHdG dalam Sampel Urin

Seiring dengan perkembangan ilmu pengetahuan, tengah diupayakan pengembangan metode untuk mendeteksi dini risiko kanker berdasarkan adanya indikasi risiko kerusakan DNA atau melalui pembentukan DNA *adduct*. DNA *adduct* memastikan telah terjadinya kerusakan pada molekul DNA, sehingga pembentukan DNA *adduct* dapat dianggap sebagai sebuah tahap awal dalam proses mutagenesis dan karsinogenesis senyawa kimia.

Kerusakan DNA dapat terjadi oleh berbagai faktor penyebab, diantaranya adanya paparan terhadap tubuh manusia oleh suatu senyawa mutagen yang diketahui berpotensi menyebabkan terjadinya mutagenesis dan karsinogenesis. Senyawa mutagen ini dapat bersumber dari eksogenus (senyawa xenobiotika dari luar tubuh) ataupun endogenus, yakni berupa senyawa radikal bebas (ROS) yang salah satunya berasal dari hasil metabolisme sel di dalam tubuh.

Di dalam tubuh, senyawa mutagen ini akan mengalami biotransformasi berupa detoksifikasi atau bioaktivasi. Detoksifikasi berarti mengubah senyawa yang reaktif menjadi kurang / tidak reaktif sehingga dapat menurunkan tingkat bahaya senyawa mutagen tersebut. Senyawa yang kurang / tidak reaktif ini akan diekskresikan keluar dari tubuh. Hal ini tentu baik bagi tubuh. Namun adalah hal yang buruk jika senyawa mutagen tersebut justru mengalami bioaktivasi, yang berarti mengubah senyawa yang kurang reaktif menjadi lebih reaktif sehingga meningkatkan risiko bahayanya. Ketika mengalami bioaktivasi, senyawa mutagen ini akan mengalami interaksi secara kimiawi dengan molekul DNA yang terdapat dalam sel tubuh. Interaksi ini dapat menyebabkan terjadinya kerusakan pada basa-basa penyusun DNA (genotoksik), salah satunya adalah dengan terbentuknya DNA *adduct* seperti 8-hidroksi-2'-deoksiguanosin, yang umumnya dikenal sebagai 8-OHdG.

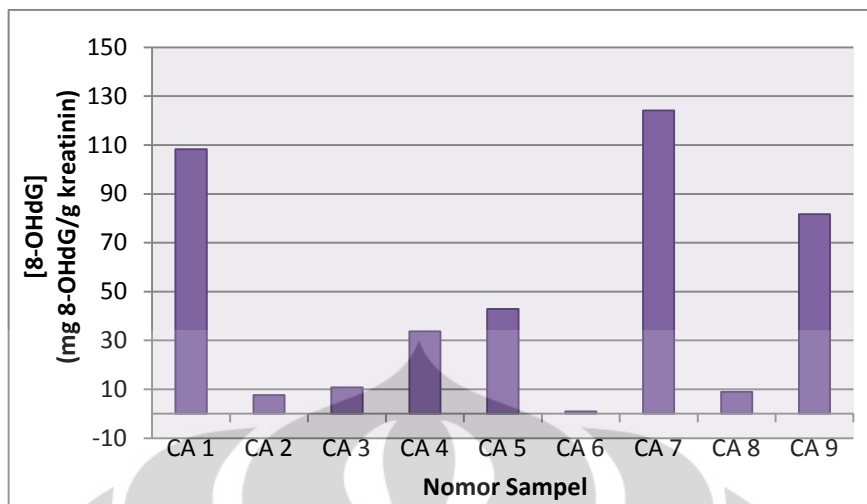
Di dalam sel sendiri terdapat sistem perbaikan DNA yang rusak dengan menggunakan serangkaian kerja enzim. Ketika enzim masih dapat mengenali struktur DNA yang rusak, maka enzim akan memperbaiki kerusakannya atau mengeliminasi dari tubuh. Inilah yang kita deteksi sebagai *adduct*. Namun ketika enzim tidak mampu lagi mengenali basa DNA yang rusak, maka akan terjadi pertumbuhan sel baru (neoplasia) yang tidak dapat terkontrol oleh enzim. Sel baru ini dapat tumbuh dengan mengalami penyebaran ataupun tidak. Ketika tidak menyebar ke organ tubuh lain (tumor jinak), maka dapat dilakukan tindakan medis untuk menghilangkannya. Akan tetapi, jika sel baru ini menyebar ke organ lain (metastasis), maka telah tercapai satu tahap pembentukan kanker.

Studi yang mengkaji tentang kerusakan DNA terhadap berbagai kelompok sampel menjadi sangat penting untuk dilakukan agar dapat dilihat tingkat kerusakannya pada masing-masing kelompok, sehingga jika ternyata ditemukan

tingkat kerusakan yang (hampir) tinggi, dapat dilakukan suatu tindakan pencegahan kerusakan DNA yang lebih serius yang dapat mengarah pada pembentukan kanker.

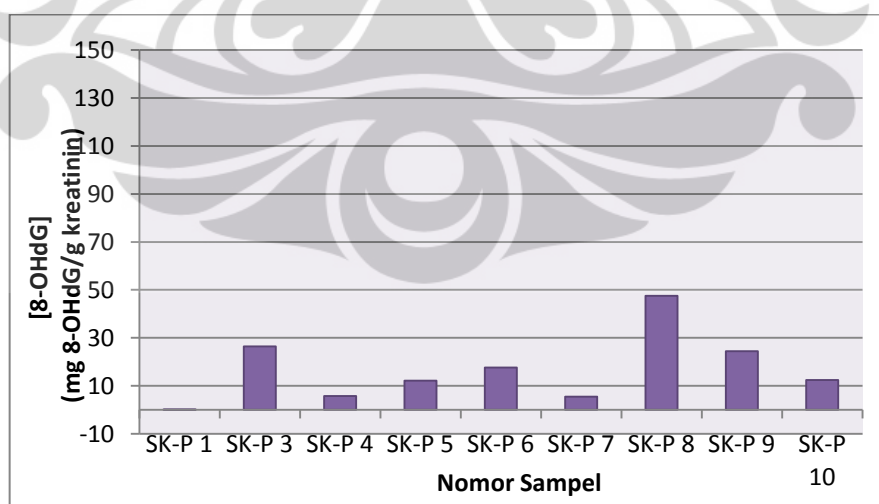
Kerusakan DNA disebabkan oleh kehadiran radikal bebas dalam bentuk ROS dan RNS yang tidak seimbang jumlahnya terhadap jumlah antioksidan di dalam tubuh. Dalam kehadiran radikal hidroksil, biasanya atom karbon pada posisi 8 dari basa guanin mengalami hidroksilasi. Produk yang terbentuk ialah 8-hidroksi-2'-deoksiganosin (8-OHdG). Akibat kereaktifan basa guanin dan produksi ROS secara terus-menerus dalam metabolisme normal sel (endogenus), 8-OHdG secara kontiniu hadir dalam DNA sebagai produk buangan mekanisme perbaikan DNA. Adanya ROS yang bersumber dari eksogenus (senyawa kimia karsinogen radiasi ionisasi, dsb) menyebabkan konsentrasi 8-OHdG meningkat. Dibandingkan dengan perubahan DNA secara spesifik, misalnya DNA *adduct* yang terbentuk dari metabolit PAH, DNA *adduct* oksidatif lebih sering terjadi. Artinya, kerusakan DNA akibat paparan spesies reaktif secara kontiniu lebih berperan dalam perkembangan kanker.

Penelitian ini mengambil sampel dari kelompok penderita kanker payudara, perokok, dan non perokok sebagai kontrol untuk dianalisis konsentrasi DNA *adduct* berupa 8-OHdG. Terdeteksinya 8-OHdG di dalam sampel urin mengindikasikan adanya faktor-faktor terbentuknya genotoksik (kerusakan DNA). Pada penelitian ini diperoleh sebanyak sembilan sampel wanita penderita kanker payudara, 18 sampel pria perokok, 10 sampel kontrol wanita, dan 22 sampel kontrol pria. Pengukuran kadar 8-OHdG dalam sampel urin dilakukan menggunakan alat HPLC dengan detektor UV pada panjang gelombang 254 nm. Adanya puncak yang muncul pada kromatogram sampel urin (Gambar 4.4) dengan waktu retensi yang sama pada kromatogram larutan standar (Gambar 4.3) menunjukkan bahwa 8-OHdG dalam sampel urin penderita kanker, sampel perokok, dan sampel kontrol dapat terdeteksi oleh metode ini.



Gambar 4.6 Konsentrasi 8-OHdG pada Sampel Penderita Kanker Payudara

Gambar 4.6 menunjukkan konsentrasi 8-OHdG (mg 8-OHdG/g kreatinin) pada sampel penderita kanker payudara. Konsentrasi 8-OHdG yang terdeteksi pada urin sampel penderita kanker payudara berkisar antara 0,913 – 124,171 mg 8-OHdG/g kreatinin dengan rerata $46,549 \pm 46,817$ mg 8-OHdG/g kreatinin ($n = 9$). Terdeteksinya 8-OHdG pada urin penderita kanker sebagaimana ditunjukkan pada Gambar 4.6 menjelaskan bahwa telah terjadi kerusakan DNA pada semua sampel penderita kanker tersebut.



Gambar 4.7 Konsentrasi 8-OHdG pada Sampel Kontrol Wanita

Gambar 4.7 menunjukkan konsentrasi 8-OHdG (mg 8-OHdG/g kreatinin) pada sampel kontrol wanita. Konsentrasi 8-OHdG berkisar antara 0,035 – 47,493 mg 8-OHdG/g kreatinin dengan rerata $16,849 \pm 14,425$ mg 8-OHdG/g kreatinin ($n = 9$). Data sampel kontrol wanita nomor 2 (SK-P 2) tidak disertakan karena nilainya memiliki perbedaan yang sangat signifikan dibandingkan sampel kontrol wanita lainnya, sehingga jika disertakan akan menyebabkan terjadinya penyimpangan hasil pengukuran.

Dari hasil analisis di atas, dapat dilihat bahwa rerata konsentrasi 8-OHdG dalam sampel urin penderita kanker payudara lebih tinggi dibandingkan dengan konsentrasi 8-OHdG dalam sampel kontrol wanita. Namun, hasil ini tidak sesuai dengan uji statistik menggunakan *Independent Sample T Test*, bahwa dengan $\alpha = 0,101$; karena $\alpha > 0,05$, maka H_0 gagal ditolak. Dapat dikatakan bahwa tidak ada perbedaan yang signifikan antara konsentrasi 8-OHdG pada sampel penderita kanker payudara dan sampel kontrol wanita.

Hal ini disebabkan oleh cukup fluktuatifnya nilai konsentrasi 8-OHdG antar individu pada sampel penderita kanker payudara. Nilai yang fluktuatif ini dapat dipengaruhi oleh adanya mekanisme perbaikan kerusakan DNA. Proses perbaikan kerusakan DNA oleh enzim dapat meningkat pada tahap lanjut dari kanker payudara. DNA *adduct* dapat terlarut oleh proses replikasi DNA pada kanker lanjutan. Hal ini menyebabkan adanya korelasi negatif antara level 8-OHdG dan tahap progresi dari kanker payudara, sehingga 8-OHdG diasumsikan berperan lebih besar pada tahap awal karsinogenesis [Matsui, *et al.*, 2000]. Alasan tersebut relevan dengan fakta bahwa semua sampel penderita kanker payudara pada penelitian ini berada pada stadium II ke atas dan sedang menjalani proses pengobatan. Proses pengobatan inilah yang kemungkinan mempengaruhi proses perbaikan DNA pada sampel penderita kanker payudara. Adanya peningkatan kemampuan perbaikan DNA menyebabkan tingkat kerusakan DNA yang dialami oleh sampel penderita kanker payudara menurun dan tidak berbeda secara signifikan melalui uji statistik terhadap sampel kontrol wanita.

Oleh karena itu, kemudian dilakukan uji terhadap sampel penderita kanker payudara yang memiliki konsentrasi 8-OHdG dalam daerah konsentrasi 8-OHdG yang sama, yaitu CA 1, CA 4, CA 5, CA 7, dan CA 9 serta dibandingkan dengan

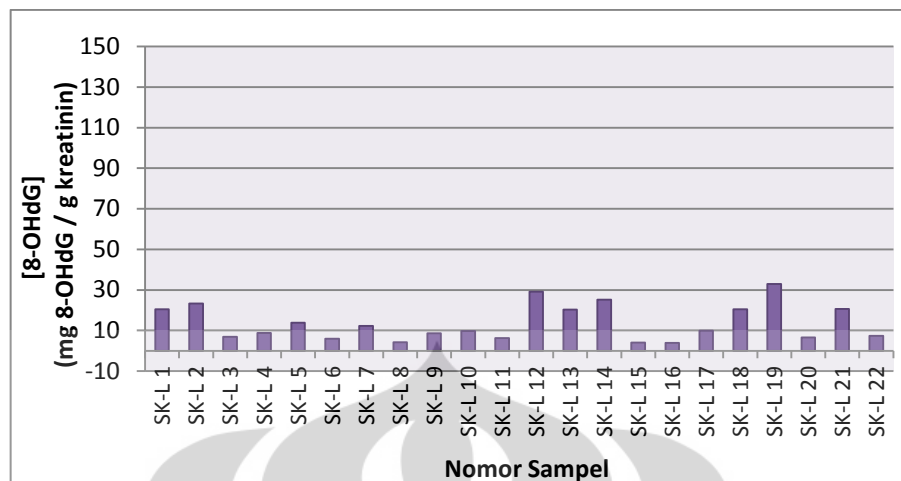
sampel kontrol wanita. Ternyata diperoleh hasil bahwa terdapat perbedaan yang signifikan pada konsentrasi 8-OHdG antara kedua kelompok sampel ini ($\alpha = 0,023$; karena $\alpha < 0,05$, maka H_0 ditolak). Uji ini dapat dilihat pada Lampiran 6. Hasil uji statistik ini menguatkan data faktual yang diperoleh sebelumnya bahwa konsentrasi 8-OHdG pada sampel kanker payudara memang lebih tinggi daripada sampel kontrol wanita. Untuk selanjutnya, semua penjelasan terkait sampel penderita kanker payudara mengacu pada data dengan jumlah sampel sebanyak lima orang.

Kelompok sampel penderita kanker payudara dan sampel kontrol wanita memiliki homogenitas yang sama dalam hal aktivitas merokok, yakni sama-sama tidak merokok. Artinya, dapat dikatakan bahwa kerusakan DNA yang digambarkan oleh konsentrasi 8-OHdG pada kedua kelompok sampel tidak dipengaruhi oleh sumber eksogenus berupa aktivitas merokok.

Banyak penelitian sebelumnya yang menunjukkan hasil bahwa pada sampel penderita kanker payudara terdeteksi 8-OHdG yang levelnya lebih tinggi secara signifikan daripada sampel non kanker, salah satunya ialah penelitian yang dilakukan oleh Matsui *et al* (2000). Penemuan ini mendukung asumsi bahwa sel kanker lebih terpapar terhadap *oxidative stress* dibandingkan dengan sel non kanker. Namun hasil yang berbeda diperoleh oleh Nagashima *et al* (1995), bahwa tidak ada perbedaan secara statistik pada level 8-OHdG antara sampel penderita kanker payudara dan sampel non kanker [Matsui, *et al.*, 2000].

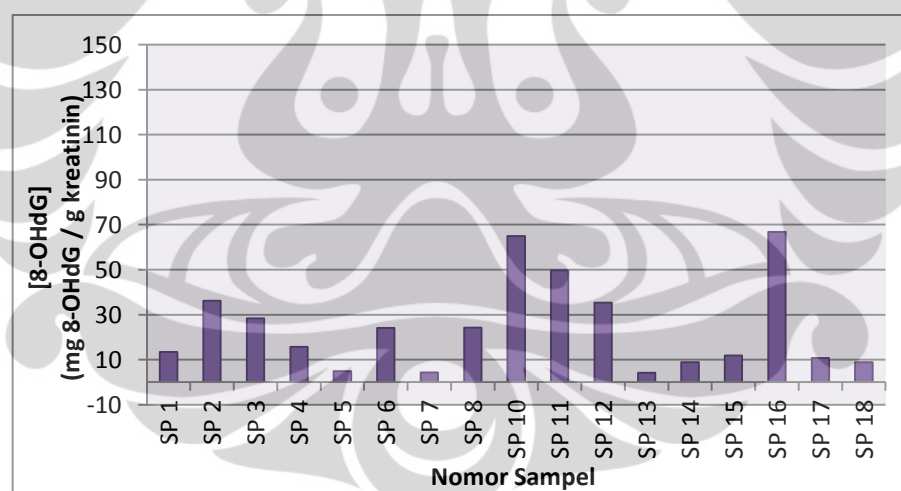
Karena adanya hambatan dalam identifikasi faktor-faktor eksogenus penyebab kerusakan DNA, yakni keterbatasan informasi yang diperoleh dari kuisioner, sehingga penelitian ini hanya memfokuskan pada sumber endogenus penyebab kerusakan DNA.

Untuk melihat pengaruh rokok terhadap konsentrasi 8-OHdG, dilakukan juga analisis pada sampel urin perokok dan sampel kontrol pria.



Gambar 4.8 Konsentrasi 8-OHdG pada Sampel Kontrol Pria

Gambar 4.8 menunjukkan konsentrasi 8-OHdG (mg 8-OHdG/g kreatinin) pada sampel kontrol pria. Konsentrasi 8-OHdG berkisar antara 3,872 – 32,951 mg 8-OHdG/g kreatinin dengan rerata $13,673 \pm 8,800$ mg 8-OHdG/g kreatinin ($n = 22$).



Gambar 4.9 Konsentrasi 8-OHdG pada Sampel Perokok

Gambar 4.9 menunjukkan konsentrasi 8-OHdG (mg 8-OHdG/g kreatinin) pada sampel perokok aktif. Konsentrasi 8-OHdG yang terdeteksi pada urin sampel perokok berkisar antara 4,121 – 66,731 mg 8-OHdG/g kreatinin dengan rerata $24,260 \pm 20,261$ mg 8-OHdG/g kreatinin ($n = 17$). Data sampel perokok aktif nomor 9 (SP 9) tidak disertakan karena nilainya memiliki perbedaan yang sangat

signifikan dibandingkan sampel perokok aktif lainnya, sehingga jika disertakan akan menyebabkan terjadinya penyimpangan hasil pengukuran.

Dari data di atas dapat dilihat bahwa rerata konsentrasi 8-OHdG dalam urin sampel perokok lebih tinggi daripada sampel non perokok (kontrol pria). Hasil ini agak berbeda dengan hasil uji statistik *Independent Sample T Test*, bahwa dengan $\alpha = 0,057$; karena $\alpha > 0,05$, maka H_0 gagal ditolak. Berarti tidak ada perbedaan yang signifikan antara konsentrasi 8-OHdG pada sampel perokok dan sampel non perokok (kontrol) pria. Dengan demikian, dapat dikatakan bahwa rokok berpengaruh terhadap meningkatnya konsentrasi 8-OHdG pada sampel perokok walaupun tidak secara signifikan.

Tabel 4.2 Rerata Konsentrasi 8-OHdG dalam Sampel

Kelompok Sampel	Jumlah Sampel	Rerata Konsentrasi 8-OHdG (mg 8-OHdG/g kreatinin)	Standar Deviasi (mg 8-OHdG/g kreatinin)
Penderita kanker payudara	9	46,549	46,817
Perokok aktif	17	24,260	20,261
Kontrol wanita	9	16,849	14,425
Kontrol pria	22	13,673	8,800

Standar deviasi yang ditampilkan pada tabel 4.2 di atas merupakan nilai standar deviasi dari pengukuran rerata konsentrasi 8-OHdG pada masing-masing kelompok sampel, bukan pada masing-masing sampel. Nilai yang cukup tinggi pada standar deviasi ini disebabkan karena sampel pada tiap kelompok yang diperoleh memang memiliki kemampuan yang berbeda-beda dalam perbaikan kerusakan DNA, sehingga rerata dan standar deviasi kelompok menjadi cukup tinggi.

Kemudian dilihat juga hubungan antara konsentrasi 8-OHdG pada sampel penderita kanker payudara dan sampel perokok. Dari Tabel 4.2 dapat dilihat bahwa rerata konsentrasi 8-OHdG pada sampel penderita kanker payudara lebih

tinggi daripada sampel perokok. Hal ini mengindikasikan bahwa walaupun sampel penderita kanker payudara pada penelitian ini tidak merokok, namun konsentrasi 8-OHdG yang terdeteksi dalam urinnya juga dipengaruhi oleh faktor-faktor eksogenus lainnya.

Jika dilihat dari rerata konsentrasi 8-OHdG pada sampel penderita kanker payudara, yaitu 46,549 mg 8-OHdG/g kreatinin dan pada sampel perokok, yaitu 24,260 mg 8-OHdG/g kreatinin, dapat dikatakan bahwa nilai ini memiliki perbedaan yang cukup signifikan. Hal ini relevan dengan hasil uji statistik *Independent Sample T test*, bahwa dengan $\alpha = 0,036$; karena $\alpha < 0,05$, maka H_0 ditolak, artinya ada perbedaan yang signifikan antara konsentrasi 8-OHdG pada sampel penderita kanker payudara dan sampel perokok. Hasil ini mendukung fakta bahwa sampel penderita kanker payudara memang memiliki tingkat kerusakan DNA yang lebih tinggi daripada sampel perokok karena proses pembentukan kanker itu sendiri membutuhkan waktu lama (paparan jangka panjang terhadap xenobiotika). Seperti yang telah disebutkan sebelumnya bahwa sampel penderita kanker payudara dalam penelitian ini berusia antara 33-62 tahun dan sedang menderita kanker stadium II ke atas, sedangkan sampel perokok berusia 20-40 tahun dan telah merokok selama 2-10 tahun.

Walaupun berdasarkan uji statistik terdapat perbedaan yang signifikan antara konsentrasi 8-OHdG pada sampel penderita kanker payudara dan sampel perokok, ada kemungkinan bahwa pada sampel perokok juga telah terjadi tahap inisiasi pembentukan kanker disebabkan adanya paparan radikal bebas dari aktivitas merokok. Namun hal ini membutuhkan studi lebih lanjut untuk membuktikannya.

Untuk melihat adanya pengaruh dari jenis kelamin terhadap konsentrasi 8-OHdG yang dihasilkan, dilakukan juga analisis dengan uji statistik *Independent Sample T test* antara sampel kontrol wanita dan kontrol pria. Kedua kelompok ini sama-sama bukan perokok dan jarang terpapar asap rokok. Pada sampel kontrol wanita diperoleh nilai rerata konsentrasi 8-OHdG sebesar 16,849 mg 8-OHdG/g kreatinin, sedangkan pada sampel kontrol pria sebesar 13,673 mg 8-OHdG/g kreatinin. Tidak ada perbedaan yang signifikan pada kedua nilai ini. Hal yang sama ditunjukkan oleh hasil uji t, bahwa dengan $\alpha = 0,457$; karena $\alpha > 0,05$, maka

Ho gagal ditolak, sehingga tidak ada perbedaan konsentrasi 8-OHdG pada sampel kontrol wanita dan sampel kontrol pria. Oleh karena itu, dapat disimpulkan bahwa jenis kelamin tidak berpengaruh terhadap konsentrasi 8-OHdG yang dihasilkan.

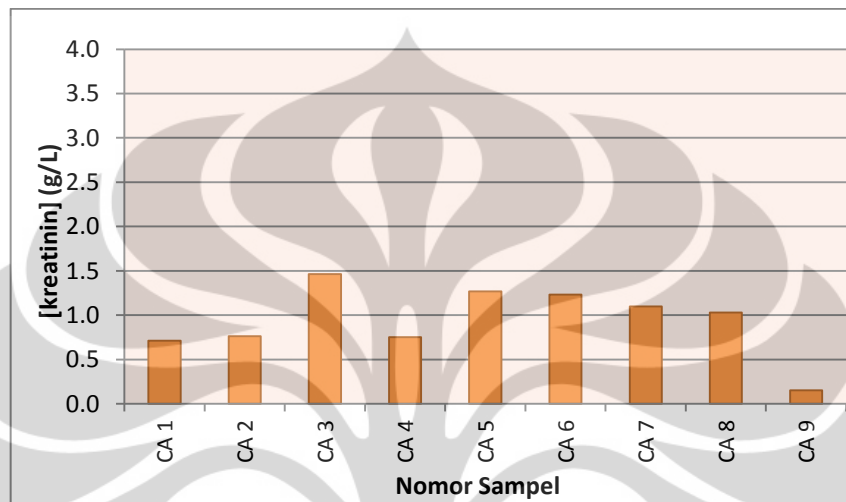
Dengan menggunakan uji statistik *Independent Sample T test* di atas, telah diketahui ada tidaknya perbedaan rerata konsentrasi 8-OHdG pada dua kelompok sampel. Untuk melihat perbedaannya secara keseluruhan, yaitu pada keempat kelompok sampel, digunakan uji statistik *one way ANOVA*. Berdasarkan hasil uji ANOVA, dapat disimpulkan bahwa rerata keempat kelompok sampel tersebut memang berbeda. Uji ANOVA dilengkapi pula dengan tes Tukey dan Bonferroni serta *Homogeneous Subsets*, yang menyatakan bahwa kelompok sampel penderita kanker payudara berbeda secara nyata dengan tiga kelompok sampel lainnya (Lampiran 6).

Adanya variasi pada konsentrasi 8-OHdG yang diekskresikan melalui urin dipengaruhi oleh tingkat paparan dan laju absorpsi terhadap senyawa mutagen; pola hidup seperti diet, rokok, alkohol; sifat genetik; dan perbedaan kemampuan dalam metabolisme dan reparasi kerusakan DNA.

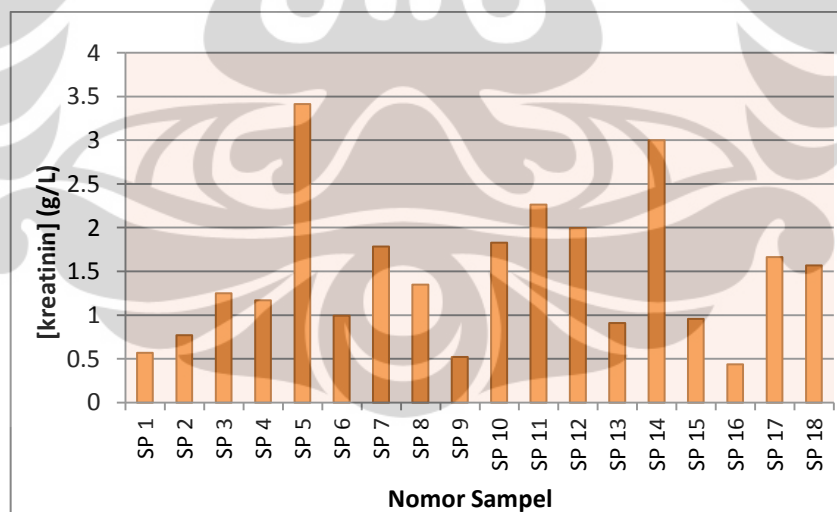
4.4 Hasil Pengukuran Kreatinin

Konsentrasi metabolit di dalam urin sangat bergantung pada laju produksi dan konsentrasi urin, terlalu pekat atau terlalu encer. Adanya perbedaan laju produksi dan konsentrasi urin pada tiap sampel dapat menyebabkan misinterpretasi pada hasil pengukuran. Agar hasil pengukuran urin dapat dibandingkan antar sampel, maka hasil analisis seringkali distandardisasi terhadap konsentrasi kreatinin. Karena ekskresi kreatinin yang relatif konstan setiap harinya, maka nilai ini dapat digunakan untuk menggambarkan fungsi kerja ginjal (glomerulus). Namun, kerusakan ginjal dapat mengubah pola ekskresi kreatinin, sehingga terkadang standardisasi yang dilakukan menjadi kurang akurat. Seperti yang telah dijelaskan sebelumnya, bahwa jumlah kreatinin yang berasal dari metabolisme kreatin dalam otot ini lebih bergantung pada massa total otot, kecuali jika terjadi cedera fisik yang berat atau penyakit degeneratif yang menyebabkan kerusakan masif pada otot.

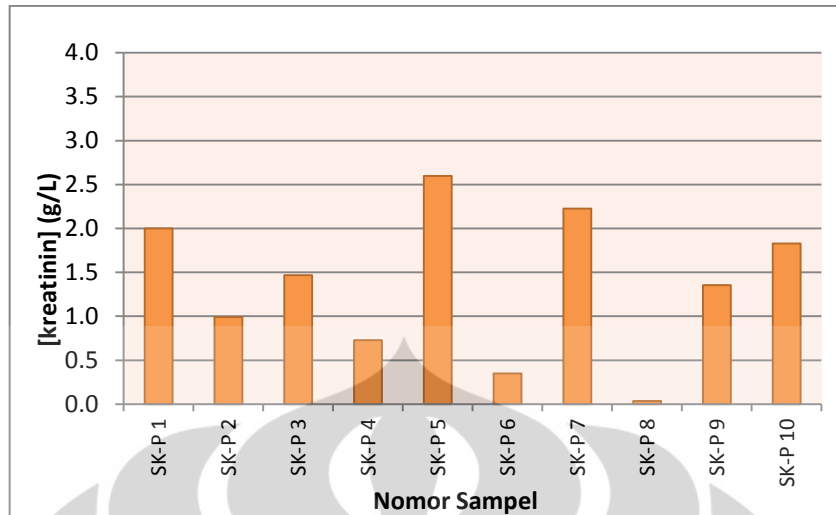
Dari hasil pengukuran menggunakan metode *de Jaffe*, diperoleh range konsentrasi kreatinin dalam sampel urin penderita kanker payudara, sampel perokok, sampel kontrol wanita, dan sampel kontrol pria masing-masing adalah 0,151-1,464 g/L (Gambar 4.10) ; 0,439-3,415 g/L (Gambar 4.11) ; 0,037-2,599 g/L (Gambar 4.12) ; 0,306-3,360 g/L (Gambar 4.13).



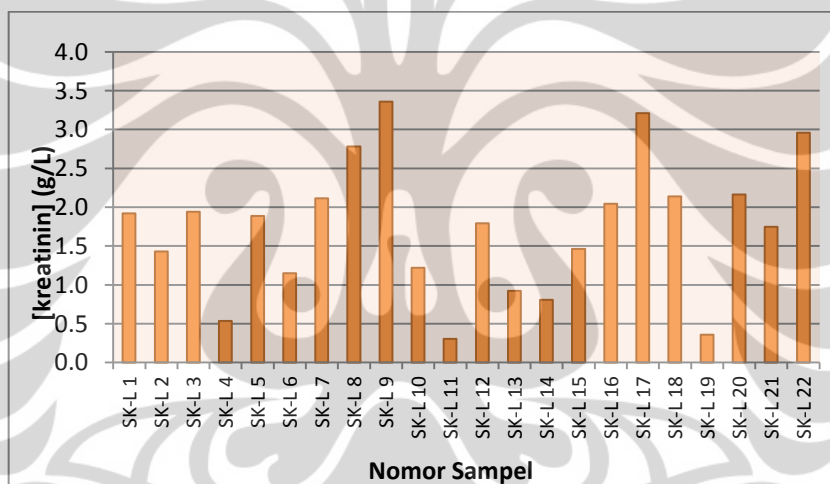
Gambar 4.10 Konsentrasi Kreatinin pada Sampel Penderita Kanker Payudara



Gambar 4.11 Konsentrasi Kreatinin pada Sampel Perokok



Gambar 4.12 Konsentrasi Kreatinin
ada Sampel Kontrol Wanita



Gambar 4.13 Konsentrasi Kreatinin
Pada Sampel Kontrol Pria

Terdeteksinya 8-OHdG dalam urin semua kelompok sampel menunjukkan bahwa secara normal, 8-OHdG memang diekskresikan oleh tubuh sebagai salah satu cara perbaikan DNA yang mengalami kerusakan akibat ROS (endogenus). Semakin tinggi tingkat paparan terhadap sumber ROS, maka akan semakin tinggi pula tingkat kerusakan DNA yang terjadi. Paparan jangka panjang dengan mekanisme perbaikan yang tidak efektif dapat meningkatkan probabilitas kerusakan DNA yang berujung pada pembentukan kanker. Dengan dilakukannya deteksi dini terhadap risiko tersebut, diharapkan kerusakan DNA dapat diminimalisasi sehingga tidak mengakibatkan terbentuknya kanker.

Oleh karena pengambilan sampel dilakukan secara acak sederhana dan *accidental*, penelitian ini bukanlah merupakan studi epidemiologik untuk keseluruhan populasi sampel, melainkan hanya menggambarkan hasil yang diperoleh terhadap sampel uji yang diperoleh dalam penelitian ini (*in situ*).



BAB 5 PENUTUP

5.1 Kesimpulan

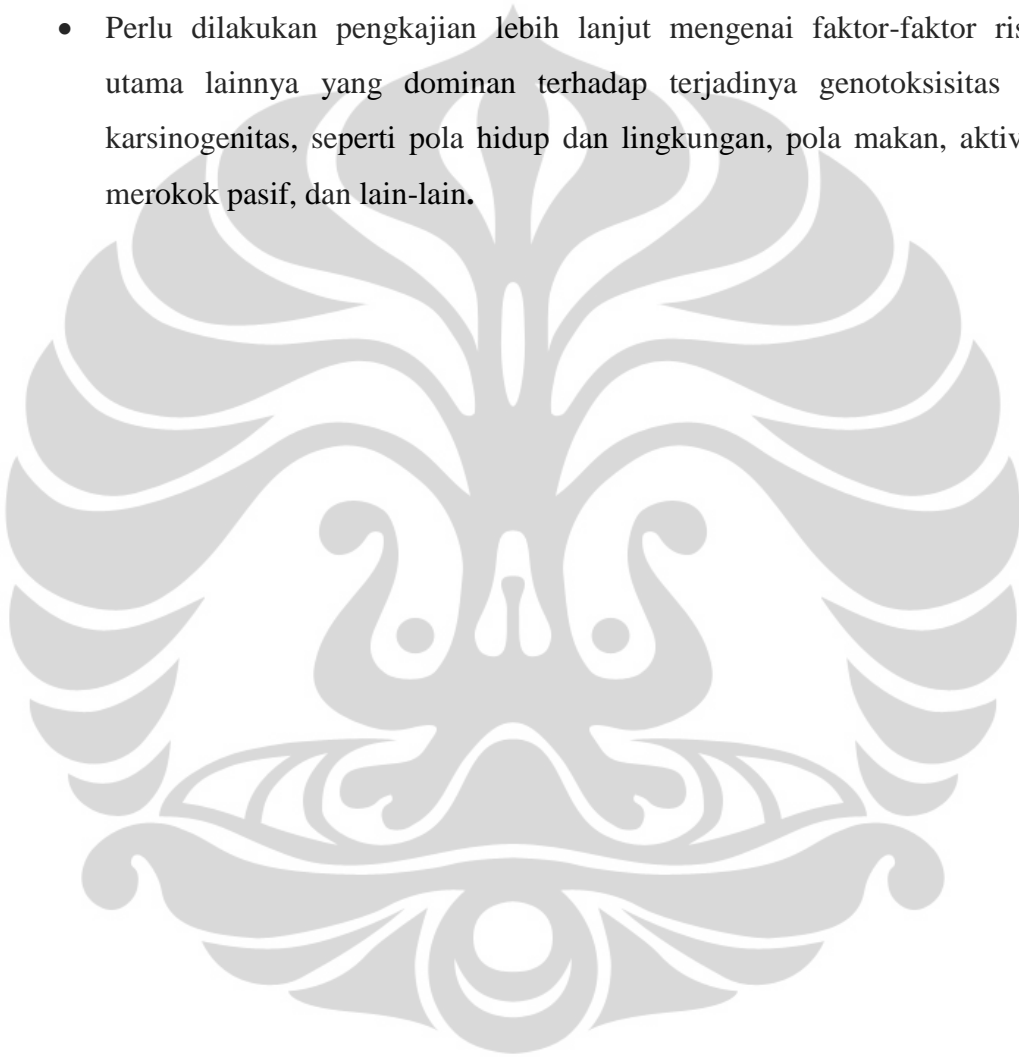
Berdasarkan hasil analisis terhadap seluruh sampel uji yang diperoleh pada penelitian ini, disimpulkan bahwa :

1. Semua sampel uji mengalami kerusakan DNA yang dibuktikan dengan terdeteksinya senyawa 8-OHdG dalam urin.
2. Konsentrasi 8-OHdG yang terdeteksi pada urin sampel kontrol secara keseluruhan berkisar antara 0,035 - 47,493 mg 8-OHdG/g kreatinin dengan rerata $15,261 \pm 11,613$ mg 8-OHdG/g kreatinin. Untuk kontrol wanita, konsentrasi 8-OHdG berkisar antara 0,035 – 47,493 mg 8-OHdG/g kreatinin dengan rerata $16,849 \pm 14,425$ mg 8-OHdG/g kreatinin. Sedangkan untuk kontrol pria, konsentrasi 8-OHdG berkisar antara 3,872 – 32,951 mg 8-OHdG/g kreatinin dengan rerata $13,673 \pm 8,800$ mg 8-OHdG/g kreatinin.
3. Konsentrasi 8-OHdG yang terdeteksi pada urin sampel perokok berkisar antara 4,121 – 66,731 mg 8-OHdG/g kreatinin dengan rerata $24,260 \pm 20,261$ mg 8-OHdG/g kreatinin.
4. Konsentrasi 8-OHdG yang terdeteksi pada urin sampel penderita kanker payudara berkisar antara 0,913 – 124,171 mg 8-OHdG/g kreatinin dengan rerata $46,549 \pm 46,817$ mg 8-OHdG/g kreatinin.
5. Dari hasil analisis di atas, dapat disimpulkan bahwa rerata konsentrasi 8-OHdG pada sampel penderita kanker payudara lebih tinggi daripada sampel perokok dan sampel kontrol.
6. Berdasarkan *Independent Sample T Test*, disimpulkan bahwa terdapat perbedaan yang signifikan pada rerata konsentrasi 8-OHdG antara sampel kanker – kontrol wanita dan antara sampel kanker – perokok. Sedangkan antara sampel perokok – kontrol pria dan antara sampel kontrol pria – kontrol wanita tidak terdapat perbedaan yang signifikan pada rerata konsentrasi 8-OHdGnya. Hasil ini didukung oleh hasil uji ANOVA bahwa rerata keempat kelompok sampel tersebut memang berbeda dengan rerata

konsentrasi 8-OHdG pada kelompok sampel penderita kanker payudara berbeda secara nyata dengan tiga kelompok sampel lainnya.

5.2 Saran

- Meningkatkan upaya strategi *sampling*, diantaranya meliputi jumlah dan homogenitas sampel, serta kuisioner yang lebih lengkap.
- Perlu dilakukan pengkajian lebih lanjut mengenai faktor-faktor risiko utama lainnya yang dominan terhadap terjadinya genotoksisitas dan karsinogenitas, seperti pola hidup dan lingkungan, pola makan, aktivitas merokok pasif, dan lain-lain.



DAFTAR PUSTAKA

- Adly, A.A.M. (2010). Oxidative Stress and Disease: an Updated Review. *Research Journal of Immunology.*, 3 (2): 129-145.
- Anand, P., A.B. Kunnumara, C. Sundaram *et al.* (2008). Cancer is preventable disease that requires major lifestyle changes. *Pharmaceutical Research*, Vol.25, No.9.
- Angerer, J. (2002). Biological Monitoring : Prospects in Occupational and Environmental Medicine. *WILEY-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, Weinheim.*
- Beach, A.C., R.C. Gupta. (1992). Human Biomonitoring and the ³²Postlabelling Assay. *Carcinogenesis*. 13 (7); 1053-1074.
- Committee on Biological Markers of the National Research Council. (1987). Biological Markers In Environmental Health Research. *Environ. Health Perspect.* 74: 3-9.
- Cooke, M.S., J. Lunec, M.D. Evans. (2002). Progress in analysis of urinary oxidative DNA damage. *Free Radical Biology and Medicine*, 33: 1601-1614.
- Creatine synthesis. <http://www.med.unibs.it/aminoacidderivatives.html> diakses 6/3/2012 pk. 14.00.
- DNA Repair Mechanisms. <http://www.web-books.com/MoBio/Free/Ch7G.htm> diakses 11/2/2012 pk. 16.25
- Esteller, Mannel, Stanley R. Hamilton, Peter C. Burger *et al.* (1999). Inactivation of the DNA Repair Gene O6-Methylguanine Methyltransferase by Promotor Hypermethylation is a Common Event in Primary Human Neoplasia Journal.
- Guarnieri, S., S. Loft *at al.* (2008). DNA repair phenotype and dietary antioxidant supplementation. *British Journal of Nutrition*, 99: 1018-1024.
- Halliwell, B., J.M. Gutteridge. (1999). Free Radicals in Biology and Medicine. *Oxford, U.K.: Oxford University Press.*
- Halliwell, B., M. Whiteman. (2004). Measuring reactive species and oxidative damage in vivo and in cell culture: how should you do it and what do the results mean?. *British Journal of Pharmacology.*, 142: 231-255.
- Hardman, A.E. (2001). Physical activity and cancer risk. *Proceedings of the Nutrition Society.*, 60: 107-113.
- Hecht, S.S. (2008). Progress and challenges in selected areas of tobacco carcinogenesis. *Chem. Res. Toxicol.*, 21: 160-171.
- Henry, J.B. (2001). Clinical Diagnosis and Management by Laboratory Methods.20th edition. *WB Saunders Company*. Philadelphia.

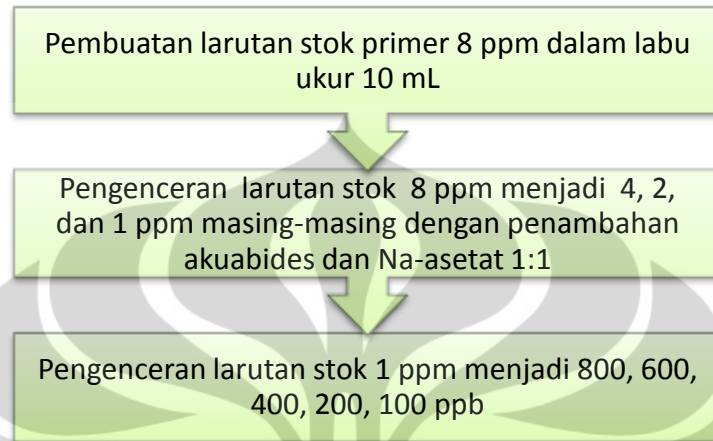
- <http://yoga8pratama.wordpress.com/2008/10/13/deskripsi-rinci-struktur-polinukleotida-dan-perbedaan-kimiawi-antara-dna-dan-rna/> diakses 28/5/2012 pk. 17.01
- <http://ghr.nlm.nih.gov/handbook/basics/dna>
- <http://labkesehatan.blogspot.com/2010/03/kreatinin-darah-serum.html> diakses 23/12/11 pk. 14.10
- <http://sciencebiotech.net/mengenal-dna-lebih-dekat-anatomi-dna/> diakses 28/5/2012 pk. 17.00
- <http://www.scribd.com/doc/86980432/In-Do>
- Hwang, E.S., P.E. Bowen. (2007). DNA damage, a biomarker of carcinogenesis: its measurement and modulation by diet and environment. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition.*, 47: 27-50.
- IARC GLOBOCAN 2008. <http://www.globocon.iarc.fr/factsheet.asp> diakses 17/12/11 pk. 20.37
- Jorgensen, E.C.B., M. Long *et al.* (2011). Perfluorinated compounds are related to breast cancer risk in Geenlandic Inuit: a case control study. *Environmental Health.*, 10:88.
- Kasai, H. (1997). Analysis of a form of oxidative DNA damage, 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine, as a marker of cellular oxidative stress during carcinogenesis. *Mutation Research.*, 387: 147-163.
- Khairani, Neera. (2008). Tesis : Studi Deteksi Benzo[a]pyrene-DNA adduct Sebagai Biomarker Risiko Kanker Akibat Paparan Polisiklik Aromatik Hidrokarbon. Depok : Departemen Kimia FMIPA Universitas Indonesia.
- Klaunig, J.E., Z.Wang *et al.* (2011). Oxidative Stress and Oxidative Damage in Chemical Carcinogenesis. *Toxicology and Applied Pharmacology.*, 254: 86-99.
- Kumaraguruparan, R., R. Subapriya *et al.* (2002). Tissue Lipid Peroxidation and Antioxidant Status in Patients with Adenocarcinoma of the Breast. *Clinica Chimica Acta.* 325: 165-170.
- Kuo, H.W., S.F. Chang, K.Y. Wu, F.Y. Wu. (2003). Chromium (VI) induced oxidative damage to DNA: increase of urinary 8-hydroxydeoxyguanosine concentrations (8-OHdG) among electroplating workers. *Occupational and Environmental Medicine.*, 60: 8.
- Levey, A.S., Coresh, J., Balk, E., Kausz, A., Levin, A., Steffes, M.W., *et al.* (2003). National Kidney Foundation Practice Guidelines for Chronic Kidney Disease: Evaluation, Classification, and Stratification. *Ann Intern Med.*
- Lodovici, M., E. Bigagli. (2009). Biomarkers of induced active and passive smoking damage. *International Journal of Environmental Research and Public Health.*, 6: 874-888.
- Malins, D.C., E.H. Holmes *et al.* (1993). The Etiology of Breast Cancer. Characteristic Alteration in Hydroxyl Radical-Induced DNA Base Lesions

- During Oncogenesis with Potential for Evaluating Incidence Risk. *Cancer*. 71: 3036-3043.
- Matsui, A., T. Ikeda *et al.* (2000). Increased formation of oxidative DNA damage, 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine, in human breast cancer tissue and its relationship to GSTP1 and COMT genotypes. *Cancer Letters*, 151: 87-95.
- Metabolisme kreatinin. <http://www.scribd.com/doc/45125261/jalur-metabolisme-kreatinin> diakses 6/5/2012 pk. 14.05.
- Moradi, M., M.H. Eftekhari *et al.* (2008). A comparative study of selenium concentration and glutathione peroxidase activity in normal and breast cancer patients. *Public Health Nutrition*, 12(1): 59-63.
- Musarrat, J., W.J. Arezina *et al.* (1996). Prognostic and Aetiological Relevance of 8-Hydroxyguanosine in Human Breast Carcinogenesis. *Eur. J. Cancer*. 32: 1209-1214.
- Nagashima, M., H. Tsuda, S. Takenoshita *et al.* (1995). 8-hydroxydeoxyguanosine levels in DNA of human breast cancer are not significantly different from those of non-cancerous breast tissues by the HPLC-ECD method, *Cancer Lett*, 90: 157±162.
- Notoatmodjo, Dr. Soekidjo. (2005). *Metodologi Penelitian Kesehatan*. Jakarta : PT. Rineka Cipta.
- Patel, B.P., U.M. Rawal *et al.* (2008). Tobacco, antioxidant enzymes, oxidative stress, and genetic susceptibility in oral cancer. *Am. J. Clin. Oncol*, 31: 454-459.
- Remer, T., A. Neubert., C. Maser-Gluth. (2002). Anthropometry-Based Reference values For 24-H Urinary Creatinine Excretion During Growth and Their Use in Endocrine and Nutritional Research. *American Journal of Clinical Nutrition*.
- Saenz, D.N. (2010). *Disertation : Biological response to 8-oxoguanine base released during DNA base excision repair*. *The University of Texas Medical Branch*.
- Santoso, Singgih. (2005). *Menguasai Statistik di Era Informasi dengan SPSS 12*. Jakarta : PT Elex Media Komputindo.
- Struktur basa DNA. <https://www.google.co.id/search?q=gambar+struktur+basa+DNA&ie=utf-8&oe=utf-8&aq=t&rls=org.mozilla:en-US:official&client=firefox-a> diakses 28/5/2012 pk. 17.05
- Valavanidis, T., Vlachogianni, C. Fiotakis. (2009). 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine (8-OHdG): A Critical Biomarker of Oxidative Stress and Carcinogenesis. *Journal of Environmental Science and Health, Part C: Environmental Carcinogenesis and Ecotoxicology Reviews*.
- Ziech, D., R. Franco *et al.* (2011). Reactive Oxygen Species (ROS) – Induced Genetic and Epigenetic Alterations in Human Carcinogenesis. *Mutation Research.*, 711: 167-173.

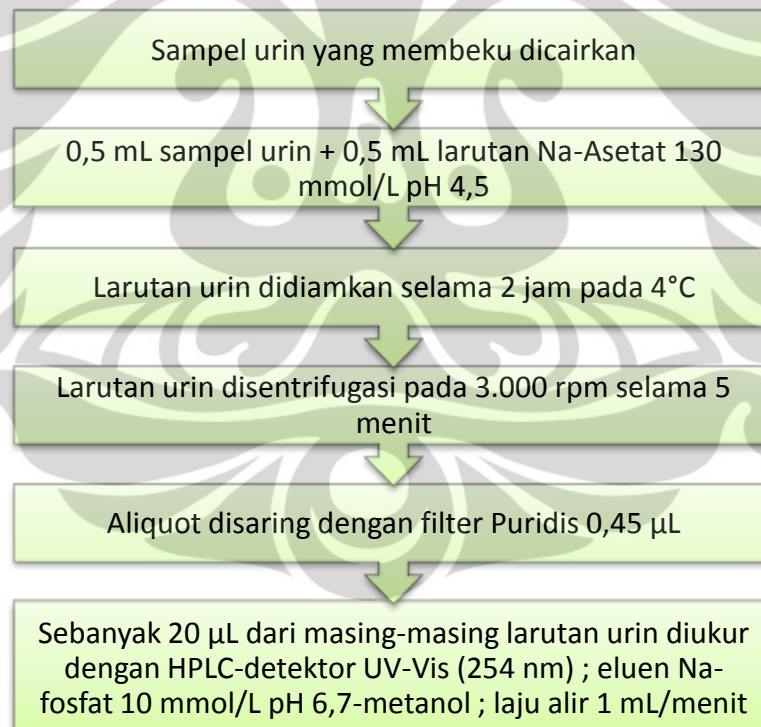
Lampiran 1 : Bagan Kerja

1. Skema Kerja 8-Hidroksi-2'-Deoksiganosin

1.1 Pembuatan Larutan Standar 8-Hidroksi-2'-Deoksiganosin

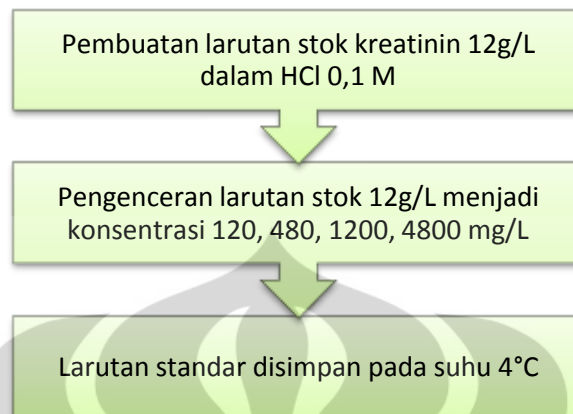


1.2 Analisa 8-Hidroksi-2'-Deoksiganosin Pada Sampel Urin

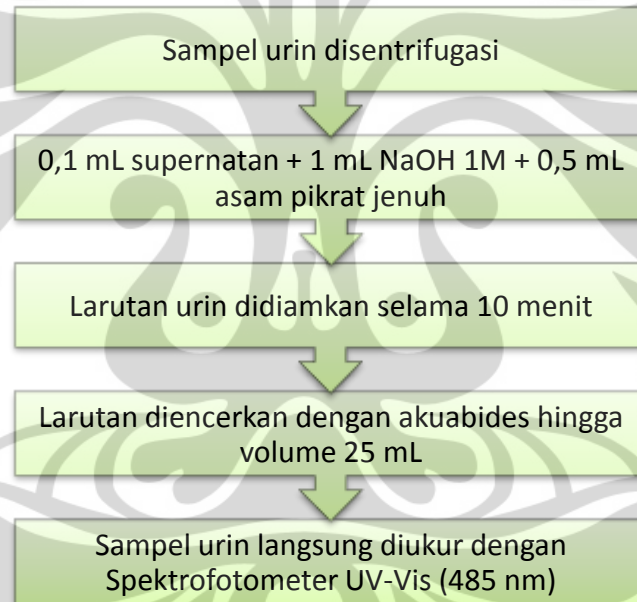


2. Skema Kerja Kreatinin

2.1 Pembuatan Larutan Stok Kreatinin



2.2 Analisa Kreatinin Pada Sampel Urin



Lampiran 2 : Data Kondisi Analisis 8-OHdG

A. Kondisi Optimum Analisis 8-OHdG

Kondisi Pengukuran

Instrumentasi : HPLC, Shimadzu LC-20AB

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

Detektor : UV-Vis, Shimadzu SPD-20A

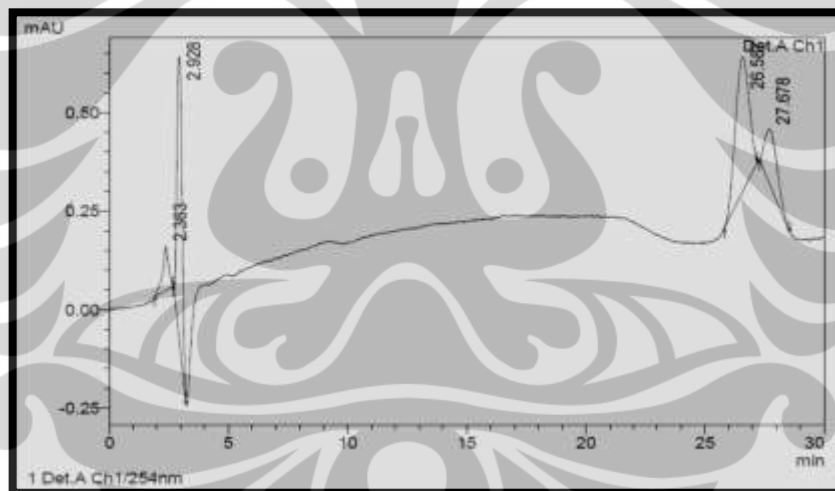
Panjang gelombang : 254 nm

Fasa gerak : Metanol : Buffer Fosfat 10 mmol/L pH 6,7 (20:80)

Laju alir : 1 mL/menit

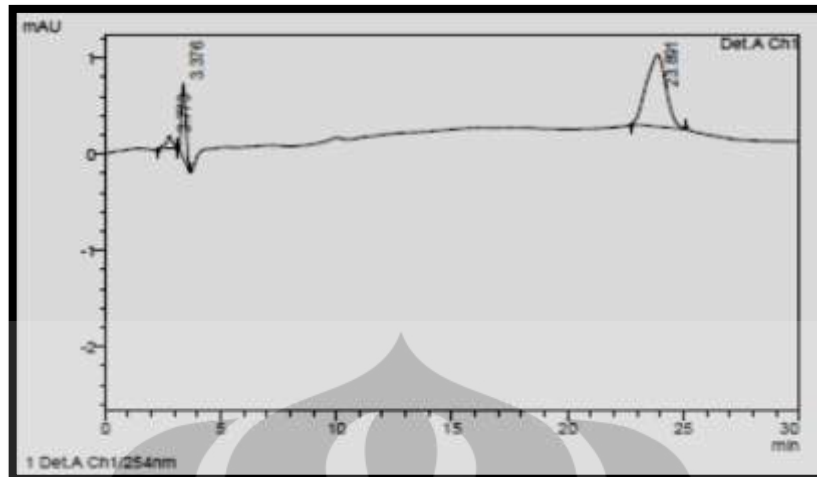
Volume injeksi : 20 µL

Kromatogram larutan standar 8-OHdG dengan variasi komposisi eluen Metanol : Buffer Fosfat dapat dilihat pada gambar berikut :

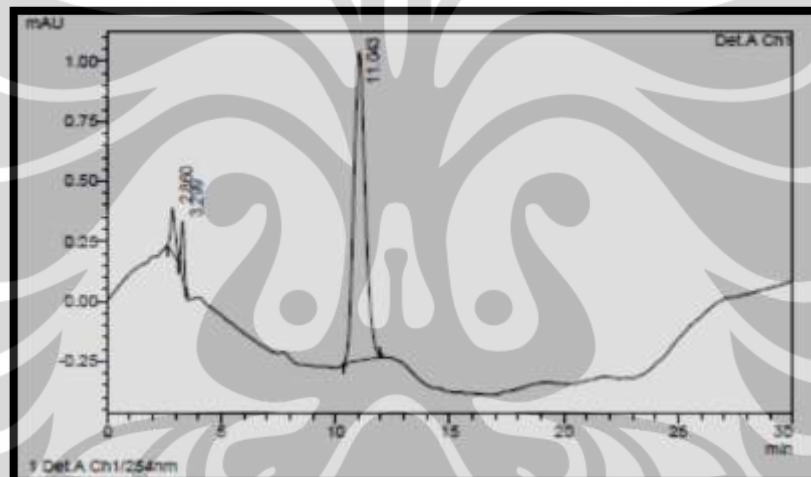


Gambar : Kromatogram larutan standar 8-OHdG pada komposisi eluen Metanol: Buffer Fosfat (5:95)

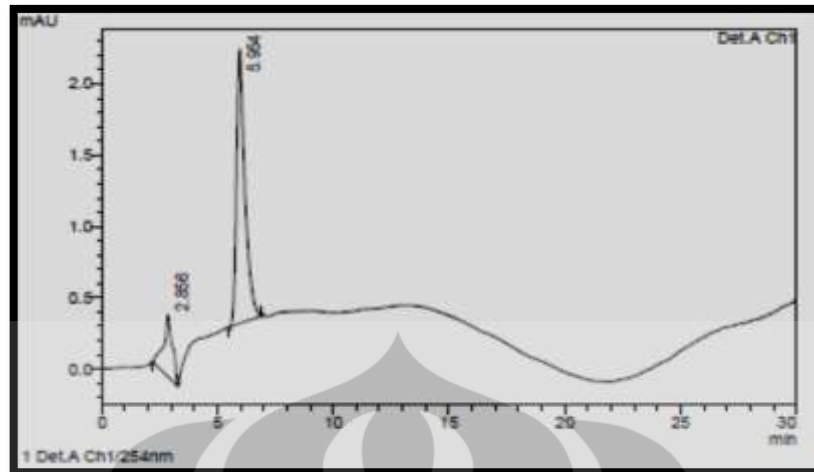
(lanjutan)



Gambar : Kromatogram larutan standar 8-OHdG pada komposisi eluen Metanol: Buffer Fosfat (10:90)



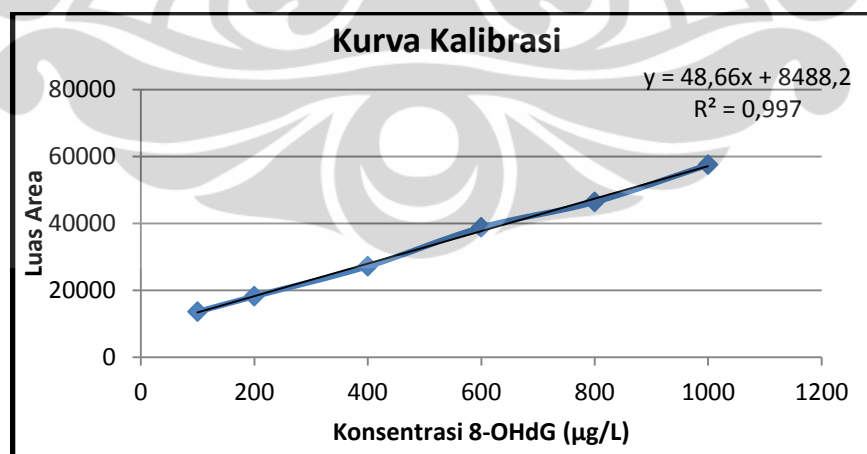
Gambar : Kromatogram larutan standar 8-OHdG pada komposisi eluen Metanol: Buffer Fosfat (20:80)



Gambar : Kromatogram larutan standar 8-OHdG pada komposisi eluen Metanol: Buffer Fosfat (30:70)

B. Penentuan LOD & LOQ

[8-OHdG] ($\mu\text{g/L}$)	Luas Area
100	13593
200	18213
400	27189
600	38821
800	46422
1000	57562



Gambar : Kurva Kalibrasi Larutan Standar 8-OHdG

Persamaan kurva kalibrasi : $y = 48,66x + 8488,2$

(lanjutan)

[8-OHdG] ($\mu\text{g/L}$)	luas puncak (y)	luas puncak (y')	selisih (y-y')	(y-y') ²
100	13593	13354,2	238,8	57025,44
200	18213	18220,2	-7,2	51,84
400	27189	27952,2	-763,2	582474,24
600	38821	37684,2	1136,8	1292314,24
800	46422	47416,2	-994,2	988433,64
1000	57562	57148,2	413,8	171230,44
			Σ	3091529,84

Keterangan :

$$y' = (b \cdot [8 - \text{OHdG}]) + a \quad ; b = 48,66 \quad a = 8488,2$$

$$S\left(\frac{y}{x}\right)^2 = \Sigma \frac{(y-y')^2}{N-2} = 1015,141$$

$$\text{LOD} = 3 \frac{s(y/x)}{b} = 62,587 \mu\text{g/L}$$

$$\text{LOQ} = 10 \frac{s(y/x)}{b} = 208,619 \mu\text{g/L}$$

C. Uji Keterulangan (Presisi)

8-OHdG] ($\mu\text{g/L}$)	Luas Area (y)	Luas Area Rata2 (y rata2)	y-y rata2	(y-y rata2) ²	Σ (y-y rata2) ²	N-1	Σ (y-y rata2) ² / (N-1)	SD	% KV
1000	68880	68208,833	671,167	450464,694	16069896,833	5	3213979,367	1792,757	2,628
	70267	68208,833	2058,167	4236050,028					
	67780	68208,833	-428,833	183898,028					
	69950	68208,833	1741,167	3031661,361					
	66176	68208,833	-2032,833	4132411,361					
2000	66200	68208,833	-2008,833	4035411,361	11848294,833	5	2369658,967	1539,370	1,628
	92733	94554,833	-1821,833	3319076,694					
	94226	94554,833	-328,833	108131,361					
	95629	94554,833	1074,167	1153834,028					
	96966	94554,833	2411,167	5813724,694					
4000	94418	94554,833	-136,833	18723,361	23902499,333	5	4780499,867	2186,435	1,229
	93357	94554,833	-1197,833	1434804,694					
	175725	177935,667	-2210,667	4887047,111					
	177982	177935,667	46,333	2146,778					
	175866	177935,667	-2069,667	4283520,111					
177997	177935,667	61,333	3761,778						
178287	177935,667	351,333	123435,111						
181757	177935,667	3821,333	14602588,444						

Lampiran 3 : Data Konsentrasi Kreatinin Dalam Sampel Urin

Konsentrasi kreatinin sampel penderita kanker payudara (CA):

Nomor Sampel	[kreatinin] (g/L)
CA 1	0,710
CA 2	0,764
CA 3	1,464
CA 4	0,753
CA 5	1,269
CA 6	1,233
CA 7	1,099
CA 8	1,028
CA 9	0,151

Konsentrasi kreatinin sampel perokok (SP) :

Nomor Sampel	[kreatinin] (g/L)
SP 1	0,571
SP 2	0,772
SP 3	1,251
SP 4	1,172
SP 5	3,415
SP 6	0,994
SP 7	1,787
SP 8	1,349
SP 9	0,524
SP 10	1,830
SP 11	2,265
SP 12	1,999
SP 13	0,910
SP 14	2,999
SP 15	0,958
SP 16	0,439
SP 17	1,665
SP 18	1,571

Konsentrasi kreatinin sampel kontrol wanita (SK-P) :

Nomor Sampel	[kreatinin] (g/L)
SK-P 1	1,999
SK-P 2	0,992
SK-P 3	1,467
SK-P 4	0,730
SK-P 5	2,599
SK-P 6	0,349
SK-P 7	2,226
SK-P 8	0,037
SK-P 9	1,356
SK-P 10	1,828

Konsentrasi kreatinin sampel kontrol pria (SK-L) :

Nomor Sampel	[kreatinin] (g/L)
SK-L 1	1,921
SK-L 2	1,431
SK-L 3	1,942
SK-L 4	0,537
SK-L 5	1,889
SK-L 6	1,153
SK-L 7	2,115
SK-L 8	2,785
SK-L 9	3,360
SK-L 10	1,222
SK-L 11	0,306
SK-L 12	1,796
SK-L 13	0,924
SK-L 14	0,808
SK-L 15	1,464
SK-L 16	2,046
SK-L 17	3,214
SK-L 18	2,142
SK-L 19	0,360
SK-L 20	2,167
SK-L 21	1,749
SK-L 22	2,960

Lampiran 4 : Data Kuantifikasi 8-OHdG Dalam Sampel

Konsentrasi 8-OHdG dalam sampel penderita kanker payudara (CA):

Nomor Sampel	[8-OHdG] (mg/L)
CA 1	76,85
CA 2	5,81
CA 3	15,78
CA 4	25,41
CA 5	54,41
CA 6	1,13
CA 7	136,46
CA 8	9,19
CA 9	12,33

Konsentrasi 8-OHdG sampel perokok (SP):

Nomor Sampel	[8-OHdG] (mg/L)
SP 1	7,63
SP 2	27,98
SP 3	35,44
SP 4	18,39
SP 5	16,89
SP 6	23,89
SP 7	7,81
SP 8	32,66
SP 9	173,96
SP 10	118,82
SP 11	112,72
SP 12	70,68
SP 13	3,75
SP 14	26,64
SP 15	11,33
SP 16	29,26
SP 17	17,89
SP 18	13,98

Konsentrasi 8-OHdG dalam sampel kontrol wanita (SK-P) :

Nomor Sampel	[8-OHdG] (mg/L)
SK-P 1	70,45
SK-P 2	202,89
SK-P 3	38,69
SK-P 4	4,16
SK-P 5	31,52
SK-P 6	6,15
SK-P 7	12,28
SK-P 8	1,76
SK-P 9	33,05
SK-P 10	22,65

Konsentrasi 8-OHdG sampel kontrol pria (SK-L) :

Nomor Sampel	[8-OHdG] (mg/L)
SK-L 1	39,33
SK-L 2	33,36
SK-L 3	13,46
SK-L 4	4,73
SK-L 5	26,18
SK-L 6	6,93
SK-L 7	26,03
SK-L 8	11,73
SK-L 9	28,83
SK-L 10	11,89
SK-L 11	1,92
SK-L 12	52,25
SK-L 13	18,69
SK-L 14	20,36
SK-L 15	5,99
SK-L 16	7,92
SK-L 17	31,82
SK-L 18	43,67
SK-L 19	11,86
SK-L 20	14,24
SK-L 21	36,12
SK-L 22	21,79

Lampiran 5 : Data Kuantifikasi 8-OHdG Per Kreatinin

Konsentrasi 8-OHdG per kreatinin sampel penderita kanker payudara (CA):

Nomor Sampel	mg 8-OHdG/g kreatinin
CA 1	108,24
CA 2	7,60
CA 3	10,78
CA 4	33,75
CA 5	42,88
CA 6	0,91
CA 7	124,17
CA 8	8,94
CA 9	81,67

Konsentrasi 8-OHdG per kreatinin sampel perokok (SP):

Nomor Sampel	mg 8-OHdG/g kreatinin
SP 1	13,37
SP 2	36,22
SP 3	28,33
SP 4	15,69
SP 5	4,95
SP 6	24,03
SP 7	4,37
SP 8	24,21
SP 9	331,834
SP 10	64,95
SP 11	49,76
SP 12	35,36
SP 13	4,12
SP 14	8,88
SP 15	11,82
SP 16	66,73
SP 17	10,74
SP 18	8,90

Konsentrasi 8-OHdG per kreatinin sampel kontrol wanita (SK-P) :

Nomor Sampel	mg 8-OHdG/g kreatinin
SK-P 1	0,04
SK-P 2	204,54
SK-P 3	26,38
SK-P 4	5,69
SK-P 5	12,13
SK-P 6	17,63
SK-P 7	5,52
SK-P 8	47,49
SK-P 9	24,37
SK-P 10	12,39

Konsentrasi 8-OHdG per kreatinin sampel kontrol pria (SK-L) :

Nomor Sampel	mg 8-OHdG/g kreatinin
SK-L 1	20,48
SK-L 2	23,31
SK-L 3	6,93
SK-L 4	8,81
SK-L 5	13,86
SK-L 6	6,02
SK-L 7	12,31
SK-L 8	4,21
SK-L 9	8,58
SK-L 10	9,72
SK-L 11	6,27
SK-L 12	29,10
SK-L 13	20,23
SK-L 14	25,19
SK-L 15	4,09
SK-L 16	3,87
SK-L 17	9,90
SK-L 18	20,39
SK-L 19	32,95
SK-L 20	6,57
SK-L 21	20,65
SK-L 22	7,36

INDEPENDENT SAMPLE T TEST

A. Uji Perbedaan Konsentrasi 8-OHdG antara Sampel Penderita Kanker Payudara (CA) dan Sampel Kontrol Wanita (SK-P)

a) $n_{CA} = 9$; $n_{SK-P} = 9$

Group Statistics

kelompok	N	Mean	Std. Deviation	Std. Error Mean
konsentrasi_8_OHdG kanker	9	4.65492E1	46.817134	15.605711
konsentrasi_8_OHdG kontrol wanita	9	1.68490E1	14.425455	4.808485

Tabel di atas memperlihatkan statistik dari kedua kelompok sampel

Independent Samples Test

	Levene's Test for Equality of Variances		t-test for Equality of Means						
	F	Sig.	t	Df	Sig. (2-tailed)	Mean Difference	Std. Error Difference	95% Confidence Interval of the Difference	
								Lower	Upper
konsentrasi_8_OHdG	12.176	.003	1.819	16	.088	29.700222	16.329720	-4.917237	64.317682
			1.819	9.505	.101	29.700222	16.329720	-6.942887	66.343332

(lanjutan)

- Uji kesamaan varians (Uji F)

Hipotesis : H_0 = kedua varians populasi adalah identik

H_1 = kedua varians populasi adalah tidak identik

Pengambilan kesimpulan :

Jika probabilitas $> 0,05$, H_0 diterima

Jika probabilitas $< 0,05$, H_0 ditolak

Keputusan :

Terlihat bahwa F hitung untuk konsentrasi 8-OHdG dengan *equal variance assumed* adalah 12,176 dengan probabilitas 0,003. Oleh karena probabilitas $< 0,05$, maka H_0 ditolak, artinya kedua varians benar-benar berbeda.

Perbedaan yang nyata dari kedua varians membuat penggunaan varians untuk membandingkan rerata populasi dengan uji t sebaiknya menggunakan dasar *equal variance not assumed*.

- Uji t

Hipotesis : H_0 = kedua rerata populasi adalah identik

H_1 = kedua rerata populasi adalah tidak identik

Berbeda dengan asumsi sebelumnya yang menggunakan varians, sekarang dipakai *mean* atau rerata hitung.

(lanjutan)

Keputusan :

Terlihat bahwa t hitung untuk konsentrasi 8-OHdG dengan *equal variance not assumed* adalah 1,819 dengan probabilitas 0,101. Oleh karena probabilitas > 0,05, maka H_0 gagal ditolak, artinya **kedua rerata konsentrasi 8-OHdG tidak berbeda secara signifikan.**

b) n CA = 5 ; n SK-P = 9

Group Statistics

kelompok	N	Mean	Std. Deviation	Std. Error Mean
konsentrasi_8_OHdG kanker	5	7.81412E1	39.532271	17.679369
konsentrasi_8_OHdG kontrol wanita	9	1.68490E1	14.425455	4.808485

Tabel di atas memperlihatkan statistik dari kedua kelompok sampel

Independent Samples Test

	Levene's Test for Equality of Variances		t-test for Equality of Means						
	F	Sig.	t	Df	Sig. (2-tailed)	Mean Difference	Std. Error Difference	95% Confidence Interval of the Difference	
								Lower	Upper
konsentrasi_8_OHdG Equal variances assumed	9.554	.009	4.278	12	.001	61.292200	14.325794	30.078976	92.505424
konsentrasi_8_OHdG Equal variances not assumed			3.345	4.601	.023	61.292200	18.321616	12.939947	109.644453

(lanjutan)

- Uji kesamaan varians (Uji F)

Hipotesis : H_0 = kedua varians populasi adalah identik

H_1 = kedua varians populasi adalah tidak identik

Pengambilan kesimpulan :

Jika probabilitas $> 0,05$, H_0 diterima

Jika probabilitas $< 0,05$, H_0 ditolak

Keputusan :

Terlihat bahwa F hitung untuk konsentrasi 8-OHdG dengan *equal variance assumed* adalah 9,554 dengan probabilitas 0,009. Oleh karena probabilitas $< 0,05$, maka H_0 ditolak, artinya kedua varians benar-benar berbeda.

Perbedaan yang nyata dari kedua varians membuat penggunaan varians untuk membandingkan rerata populasi dengan uji t sebaiknya menggunakan dasar *equal variance not assumed*.

- Uji t

Hipotesis : H_0 = kedua rerata populasi adalah identik

H_1 = kedua rerata populasi adalah tidak identik

Berbeda dengan asumsi sebelumnya yang menggunakan varians, sekarang dipakai *mean* atau rerata hitung.

(lanjutan)

Keputusan :

Terlihat bahwa t hitung untuk konsentrasi 8-OHdG dengan *equal variance not assumed* adalah 3,345 dengan probabilitas 0,023. Oleh karena probabilitas $< 0,05$, maka H_0 ditolak, artinya **kedua rerata konsentrasi 8-OHdG berbeda secara signifikan.**

B. Uji Perbedaan Konsentrasi 8-OHdG Antara Sampel Perokok (SP) dan Sampel Kontrol Pria (SK-L)

Group Statistics

kelompok	N	Mean	Std. Deviation	Std. Error Mean
konsentrasi_8_OHdG perokok	17	2.42604E1	20.260946	4.914001
kontrol pria	22	1.36728E1	8.799818	1.876128

Tabel di atas memperlihatkan statistik dari kedua kelompok sampel

Independent Samples Test

	Levene's Test for Equality of Variances		t-test for Equality of Means						
	F	Sig.	t	Df	Sig. (2-tailed)	Mean Difference	Std. Error Difference	95% Confidence Interval of the Difference	
								Lower	Upper
konsentrasi_8_OHdG	9.669	.004	2.203	37	.034	10.587535	4.805634	.850395	20.324675
			2.013	20.670	.057	10.587535	5.259968	-.361816	21.536886

(lanjutan)

- Uji kesamaan varians (Uji F)

Hipotesis : H_0 = kedua varians populasi adalah identik

H_1 = kedua varians populasi adalah tidak identik

Pengambilan kesimpulan :

Jika probabilitas $> 0,05$, H_0 diterima

Jika probabilitas $< 0,05$, H_0 ditolak

Keputusan :

Terlihat bahwa F hitung untuk konsentrasi 8-OHdG dengan *equal variance assumed* adalah 9,669 dengan probabilitas 0,004. Oleh karena probabilitas $< 0,05$, maka H_0 ditolak, artinya kedua varians benar-benar berbeda.

Perbedaan yang nyata dari kedua varians membuat penggunaan varians untuk membandingkan rerata populasi dengan uji t sebaiknya menggunakan dasar *equal variance not assumed*.

- Uji t

Hipotesis : H_0 = kedua rerata populasi adalah identik

H_1 = kedua rerata populasi adalah tidak identik

Berbeda dengan asumsi sebelumnya yang menggunakan varians, sekarang dipakai *mean* atau rerata hitung.

(lanjutan)

Keputusan :

Terlihat bahwa t hitung untuk konsentrasi 8-OHdG dengan *equal variance not assumed* adalah 2,013 dengan probabilitas 0,057. Oleh karena probabilitas > 0,05, maka H_0 gagal ditolak, artinya **kedua rerata konsentrasi 8-OHdG tidak berbeda secara signifikan.**

C. Uji Perbedaan Konsentrasi 8-OHdG Antara Sampel Penderita Kanker Payudara (CA) dan Sampel Perokok Aktif (SP)

Group Statistics

kelompok	N	Mean	Std. Deviation	Std. Error Mean
konsentrasi_8_OHdG perokok	17	2.42604E1	20.260946	4.914001
kanker	5	7.81412E1	39.532271	17.679369

Tabel di atas memperlihatkan statistik dari kedua kelompok sampel

Independent Samples Test

	Levene's Test for Equality of Variances		t-test for Equality of Means						
	F	Sig.	t	Df	Sig. (2-tailed)	Mean Difference	Std. Error Difference	95% Confidence Interval of the Difference	
								Lower	Upper
konsentrasi_8_OHdG	5.727	.027	-4.183	20	.000	-53.880847	12.880092	-80.748249	-27.013445
			-2.936	4.635	.036	-53.880847	18.349591	-102.189367	-5.572327

(lanjutan)

- Uji kesamaan varians (Uji F)

Hipotesis : H_0 = kedua varians populasi adalah identik

H_1 = kedua varians populasi adalah tidak identik

Pengambilan kesimpulan :

Jika probabilitas $> 0,05$, H_0 diterima

Jika probabilitas $< 0,05$, H_0 ditolak

Keputusan :

Terlihat bahwa F hitung untuk konsentrasi 8-OHdG dengan *equal variance assumed* adalah 5,727 dengan probabilitas 0,027. Oleh karena probabilitas $< 0,05$, maka H_0 ditolak, artinya kedua varians benar-benar berbeda.

Perbedaan yang nyata dari kedua varians membuat penggunaan varians untuk membandingkan rerata populasi dengan uji t sebaiknya menggunakan dasar *equal variance not assumed*.

- Uji t

Hipotesis : H_0 = kedua rerata populasi adalah identik

H_1 = kedua rerata populasi adalah tidak identik

Berbeda dengan asumsi sebelumnya yang menggunakan varians, sekarang dipakai *mean* atau rerata hitung.

(lanjutan)

Keputusan :

Terlihat bahwa t hitung untuk konsentrasi 8-OHdG dengan *equal variance not assumed* adalah -2,936 dengan probabilitas 0,036. Oleh karena probabilitas $< 0,05$, maka H_0 ditolak, artinya **kedua rerata konsentrasi 8-OHdG berbeda secara signifikan.**

D. Uji Perbedaan Konsentrasi 8-OHdG Antara Sampel Kontrol Wanita (SK-P) dan Sampel Kontrol Pria (SK-L)

Group Statistics

kelompok	N	Mean	Std. Deviation	Std. Error Mean
konsentrasi_8_OHdG kontrol pria	22	1.36728E1	8.799818	1.876128
konsentrasi_8_OHdG kontrol wanita	9	1.68490E1	14.425455	4.808485

Tabel di atas memperlihatkan statistik dari kedua kelompok sampel

Independent Samples Test

	Levene's Test for Equality of Variances		t-test for Equality of Means						
	F	Sig.	t	df	Sig. (2-tailed)	Mean Difference	Std. Error Difference	95% Confidence Interval of the Difference	
								Lower	Upper
konsentrasi_8_OHdG	1.936	.175	-.754	29	.457	-3.176182	4.215102	-11.797034	5.444670
			-.615	10.528	.551	-3.176182	5.161529	-14.599057	8.246693

(lanjutan)

- Uji kesamaan varians (Uji F)

Hipotesis : H_0 = kedua varians populasi adalah identik

H_1 = kedua varians populasi adalah tidak identik

Pengambilan kesimpulan :

Jika probabilitas $> 0,05$, H_0 diterima

Jika probabilitas $< 0,05$, H_0 ditolak

Keputusan :

Terlihat bahwa F hitung untuk konsentrasi 8-OHdG dengan *equal variance assumed* adalah 1,936 dengan probabilitas 0,175. Oleh karena probabilitas $> 0,05$, maka H_0 gagal ditolak, artinya kedua varians tidak berbeda.

Tidak adanya perbedaan dari kedua varians membuat penggunaan varians untuk membandingkan rerata populasi dengan uji t sebaiknya menggunakan dasar *equal variance assumed*.

- Uji t

Hipotesis : H_0 = kedua rerata populasi adalah identik

H_1 = kedua rerata populasi adalah tidak identik

Berbeda dengan asumsi sebelumnya yang menggunakan varians, sekarang dipakai *mean* atau rerata hitung.

(lanjutan)

Keputusan :

Terlihat bahwa t hitung untuk konsentrasi 8-OHdG dengan *equal variance assumed* adalah -0,754 dengan probabilitas 0,457. Oleh karena probabilitas > 0,05, maka H_0 gagal ditolak, artinya **kedua rerata konsentrasi 8-OHdG tidak berbeda secara signifikan.**

ONE WAY ANOVA TEST

Rerata Konsentrasi 8-OHdG dalam Sampel

Descriptives

konsentrasi_8_OHdG

	N	Mean	Std. Deviation	Std. Error	95% Confidence Interval for Mean		Minimum	Maximum
					Lower Bound	Upper Bound		
perokok	17	2.42604E1	20.260946	4.914001	13.84314	34.67757	4.121	66.731
kontrol pria	22	1.36728E1	8.799818	1.876128	9.77120	17.57444	3.872	32.951
kanker	5	7.81412E1	39.532271	1.767937E1	29.05540	127.22700	33.749	124.171
kontrol wanita	9	1.68490E1	14.425455	4.808485	5.76061	27.93739	.035	47.493
Total	53	2.36901E1	25.407894	3.490043	16.68681	30.69338	.035	124.171

Keterangan : SP 9 dan NK 2 tidak disertakan

Tabel di atas memperlihatkan ringkasan statistik dari keempat kelompok sampel

(lanjutan)

Test of Homogeneity of Variances

konsentrasi_8_OHdG

Levene Statistic	df1	df2	Sig.
9.754	3	49	.000

Analisis *Homogeneity of Variances* ini bertujuan untuk menguji berlaku tidaknya asumsi untuk ANOVA, yaitu apakah keempat kelompok sampel mempunyai varians yang sama .

Hipotesis : H_0 = kedua varians populasi adalah identik
 H_1 = kedua varians populasi adalah tidak identik

Pengambilan kesimpulan :

Jika probabilitas $> 0,05$, H_0 diterima

Jika probabilitas $< 0,05$, H_0 ditolak

Keputusan :

Terlihat bahwa Levene Test hitung adalah 9,754 dengan nilai probabilitas 0,000. Oleh karena probabilitas $< 0,05$, maka H_0 ditolak. Atau, keempat varians adalah berbeda. Dengan demikian, asumsi kesamaan varians untuk uji ANOVA tidak terpenuhi.

(lanjutan)

ANOVA

konsentrasi_8_OHdG

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	17458.956	3	5819.652	17.701	.000
Within Groups	16110.219	49	328.780		
Total	33569.176	52			

Uji ANOVA dilakukan untuk menguji apakah keempat sampel mempunyai rerata (mean) yang sama.

Analisis dengan memakai ANOVA :

Hipotesis :

H_0 = kedua rerata populasi adalah identik

H_1 = kedua rerata populasi adalah tidak identik

Berbeda dengan asumsi sebelumnya yang menggunakan varians, sekarang dipakai *mean*.

Pengambilan kesimpulan :

Jika probabilitas $> 0,05$, H_0 diterima

Jika probabilitas $< 0,05$, H_0 ditolak

Keputusan :

Terlihat bahwa F hitung adalah 17,701 dengan probabilitas 0,000. Oleh karena probabilitas $< 0,05$, maka H_0 ditolak. Artinya, rerata keempat kelompok sampel tersebut memang berbeda.

(lanjutan)

Post Hoc Tests

Multiple Comparisons

Dependent Variable:konsentrasi_8_OHdG

	(I) kelompok	(J) kelompok	Mean Difference (I-J)	Std. Error	Sig.	95% Confidence Interval	
						Lower Bound	Upper Bound
Tukey HSD	perokok	kontrol pria	10.587535	5.855301	.282	-4.98428	26.15935
		kanker	-53.880847*	9.224749	.000	-78.41351	-29.34818
		kontrol wanita	7.411353	7.474698	.755	-12.46716	27.28986
	kontrol pria	perokok	-10.587535	5.855301	.282	-26.15935	4.98428
		kanker	-64.468382*	8.983348	.000	-88.35906	-40.57771
		kontrol wanita	-3.176182	7.174654	.971	-22.25674	15.90438
	kanker	perokok	53.880847*	9.224749	.000	29.34818	78.41351
		kontrol pria	64.468382*	8.983348	.000	40.57771	88.35906
		kontrol wanita	61.292200*	1.011371E1	.000	34.39540	88.18900
kontrol wanita	perokok	-7.411353	7.474698	.755	-27.28986	12.46716	
	kontrol pria	3.176182	7.174654	.971	-15.90438	22.25674	
	kanker	-61.292200*	1.011371E1	.000	-88.18900	-34.39540	
Bonferroni	perokok	kontrol pria	10.587535	5.855301	.460	-5.51227	26.68734
		kanker	-53.880847*	9.224749	.000	-79.24532	-28.51637
		kontrol wanita	7.411353	7.474698	1.000	-13.14116	27.96387
	kontrol pria	perokok	-10.587535	5.855301	.460	-26.68734	5.51227

(lanjutan)

	kanker	-64.468382*	8.983348	.000	-89.16910	-39.76767
	kontrol wanita	-3.176182	7.174654	1.000	-22.90369	16.55133
kanker	perokok	53.880847*	9.224749	.000	28.51637	79.24532
	kontrol pria	64.468382*	8.983348	.000	39.76767	89.16910
	kontrol wanita	61.292200*	1.011371E1	.000	33.48343	89.10097
kontrol wanita	perokok	-7.411353	7.474698	1.000	-27.96387	13.14116
	kontrol pria	3.176182	7.174654	1.000	-16.55133	22.90369
	kanker	-61.292200*	1.011371E1	.000	-89.10097	-33.48343

*. The mean difference is significant at the 0.05 level.

Setelah diketahui bahwa ada perbedaan yang signifikan di antara keempat kelompok sampel, untuk menentukan mana saja kelompok sampel yang berbeda dan mana yang tidak berbeda, dilakukan analisis Bonferroni dan Tukey dalam post hoc berikut:

Tukey test dan Bonferroni test

Pengambilan kesimpulan :

Berdasarkan pada nilai probabilitas :

Jika probabilitas $> 0,05$, H_0 diterima

Jika probabilitas $< 0,05$, H_0 ditolak

(lanjutan)

Hasil uji signifikansi dengan mudah dapat dilihat pada output dengan ada atau tidaknya tanda “ * ” pada kolom ‘Mean Difference’. Jika ada tanda “ * “, berarti ada perbedaan signifikan. Jika tidak ada tanda “ * “, berarti perbedaan tidak signifikan.

Keputusan :

Dengan melihat ada tidaknya tanda “ * “ pada kolom *Mean Difference*”, terlihat bahwa :

- Mean dari kelompok perokok berbeda secara nyata dengan kelompok kanker.
- Mean dari kelompok kontrol pria berbeda secara nyata dengan kelompok kanker.
- Mean dari kelompok kanker berbeda secara nyata dengan kelompok perokok, kelompok kontrol pria, dan kelompok kontrol wanita.
- Mean dari kelompok kontrol wanita berbeda secara nyata dengan kelompok kanker.

Homogenous Subsets

konsentrasi_8_OHdG

kelompok	N	Subset for alpha = 0.05	
		1	2
Tukey HSD ^a kontrol pria	22	13.67282	
kontrol wanita	9	16.84900	
perokok	17	24.26035	
kanker	5		78.14120
Sig.		.579	1.000

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 9.630.

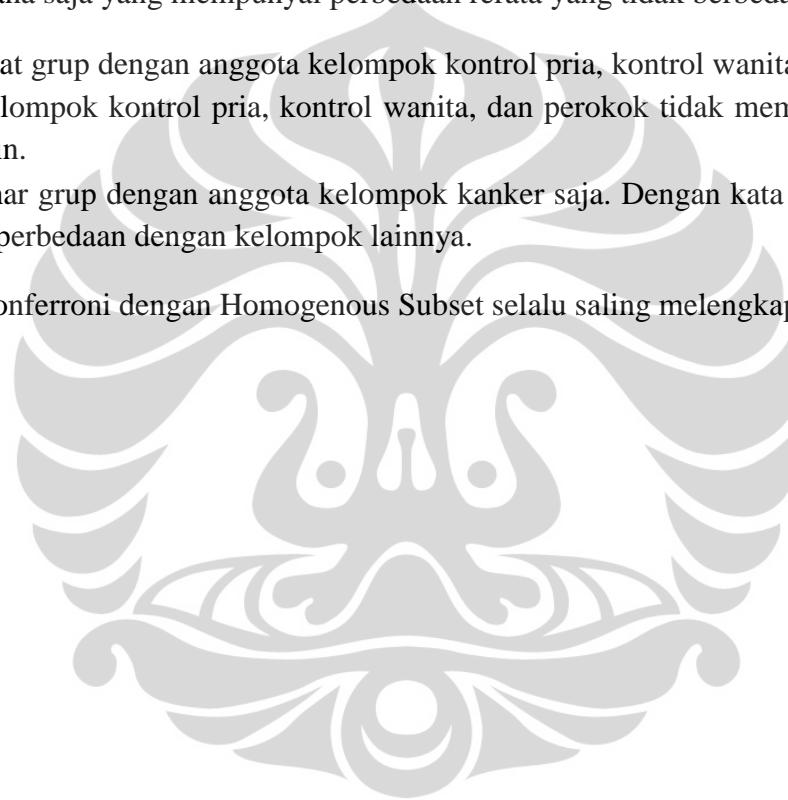


(lanjutan)

Jika tes Tukey dan Bonferroni untuk menguji kelompok mana saja yang memiliki perbedaan nyata, dalam Homogenous Subset akan dicari grup / subset mana saja yang mempunyai perbedaan rerata yang tidak berbeda secara signifikan.

- Pada subset 1, terlihat grup dengan anggota kelompok kontrol pria, kontrol wanita, dan perokok. Dengan kata lain, dapat dikatakan bahwa kelompok kontrol pria, kontrol wanita, dan perokok tidak memiliki perbedaan yang signifikan antara satu dengan yang lain.
- Pada subset 2, terlihat grup dengan anggota kelompok kanker saja. Dengan kata lain, dapat dikatakan bahwa kelompok kanker mempunyai perbedaan dengan kelompok lainnya.

Hasil dari uji Tukey dan Bonferroni dengan Homogenous Subset selalu saling melengkapi.



Lampiran 7 : Informed Consent

PENJELASAN MENGENAI PENELITIAN STUDI DETEKSI SENYAWA 8-HIDROKSI-2'-DEOKSIGUANOSIN (8-OHdG) SEBAGAI BIOMARKER GENOTOKSISITAS DAN FORMULIR PESETUJUAN SETELAH PENJELASAN (INFORMED CONSENT)

Kami meminta Anda untuk turut mengambil bagian dalam suatu penelitian yang berjudul “Studi Deteksi Senyawa 8-Hidroksi-2'- Deoksiganosin (8-OHdG) Sebagai Biomarker Genotoksitas” karena kami melihat adanya kemungkinan risiko kanker dan gangguan kesehatan yang disebabkan oleh paparan bahan kimia di lingkungan dan diduga menyebabkan timbulnya kanker.

Penelitian ini akan dilakukan oleh Vina Yusrika Utami, mahasiswi Sarjana Strata Satu Ilmu Kimia, Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Universitas Indonesia, untuk mengetahui adanya kerusakan DNA oleh senyawa karsinogen (penyebab kanker) melalui pembentukan biomarker (penanda biologik) yang dianalisis dari urin orang yang berisiko terpapar senyawa karsinogen.

Manfaat Penelitian

Hasil penelitian ini diharapkan dapat memberikan informasi ilmiah terkait senyawa karsinogen yang terdapat di lingkungan sebagai salah satu penyebab kanker. Partisipasi Anda dalam penelitian ini akan memberikan 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 kira-kira sebanyak 50 mL untuk keperluan penelitian kami. Urin ini akan kami periksa untuk mengetahui adanya biomarker berupa 8-Hidroksi-2'-Deoksiganosin terhadap kerusakan DNA dan risiko kanker. Pengambilan urin ini tidak berisiko terhadap kesehatan.

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 karsinogen lain melalui lingkungan.

Anda tidak dapat dan tidak akan dipaksa untuk ikut serta dalam penelitian ini bila Anda tidak menghendaknya. 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 peneliti

tanggal

Lampiran 8 : Kuisioner



LEMBAR ANGGKET

NO. SAMPEL

Dengan hormat, bersama ini saya mohon kesediaan Anda untuk mengisi lembar angket ini sesuai dengan keadaan yang sebenarnya. Jawaban yang Anda berikan pada formulir ini akan digunakan untuk penelitian mengenai "Studi Deteksi Senyawa 8-Hidroksi-2'-Deoksiguanosin (8-OHdG) Sebagai Biomarker Genotoksitas". Silakan jawab pertanyaan sebaik yang Anda bisa. Jika ada yang tidak dimengerti, jangan ragu untuk menanyakannya pada saya. Atas kerjasamanya pada penelitian ini, saya ucapkan terima kasih.

Sampel : Perokok / Non Perokok*
 Sampel nomor :
 Tanggal pengambilan sampel :
 Waktu pengambilan sampel :
 Cara pengisian : Sendiri / Wawancara*

DATA RESPONDEN

Nama responden :
 Jenis kelamin : Pria/Wanita*
 Usia : tahun

* coret yang tidak perlu

Catatan : beri tanda silang (X) pada pilihan

STATUS KESEHATAN

S1 Apakah Anda menderita gangguan pernapasan? (Misal : Batuk, asma, dll)
 (1) Sering (2) Kadang-kadang (3) Tidak pernah

Sebutkan gangguan pernapasan yang dialami:.....

S2 Apakah Anda sedang atau pernah menderita salah satu dari penyakit di bawah ini ?

Penyakit	Ya	Tidak
Ginjal		
Kanker		
Diabetes		

KONDISI PEKERJAAN:

S3 Pekerjaan :
 Lokasi bekerja :
 Lama bekerja : tahun
 Waktu bekerja : jam per hari
 Frekuensi bekerja : hari per minggu

S4 Penggunaan masker saat bekerja :
 (1) Sering (2) Kadang-kadang (3) Tidak pernah

S5 Transportasi yang Anda gunakan untuk mencapai tempat kerja :
 (1) Jalan kaki (3) Bus/angkutan umum (5)Lainnya:
 (2) Mobil (4) Motor

- S6 Berapa lama Anda terpapar asap kendaraan setiap harinya ?
(1) < 15 menit (2) 15-30 menit (3) 30-60 menit (4) 1-2 jam (5) > 2 jam

KEBIASAAN SEHARI-HARI

- S7 **Aktifitas Merokok :**
(1) Perokok Aktif (2) Perokok pasif (suami / istri / keluarga ialah perokok) (3) Tidak Merokok
Jika perokok pasif, lanjutkan ke S15.
- S8 **Jika perokok aktif, apakah masih merokok hingga saat ini ? ya / tidak ***
Jika tidak, lanjutkan ke S14.
- S9 **Jika perokok aktif, apakah jenis rokok yang Anda hisap ?**
(1) filter (2) kretek (non filter)
- S10 **Jika perokok aktif, apakah merek rokok yang Anda hisap ?**
(1) Sampoerna A-Mild (2) Djarum Super (3) Dji Sam Soe
(4) Gudang Garam (5) Lucky Strike (6) Marlboro
(7) Rokok Herbal (8) Clas Mild
(9) lain-lain, sebutkan
- S11 **Jika perokok aktif, jumlah rokok yang dihisap per hari :**
(1) 1-3 batang (2) 4-6 batang (3) 7-9 batang (4) 10-12 batang (5) 2 bungkus (6) lain-lain, sebutkan
- S12 **Jika perokok aktif, lama merokok :**
(1) < 1 tahun (2) 1-2 tahun (3) 2-5 tahun (4) 5-10 tahun (5) > 10 tahun
- S13 **Jika perokok aktif, sebelum anda diambil urinnya untuk sampel penelitian ini, kapan anda terakhir merokok?**
(1) < 1 jam (2) 1-2 jam (3) 2-5 jam (4) 5-10 jam (5) > 10 jam
- S14 **Jika telah berhenti merokok, sudah berapa lama :**
(1) < 1 tahun (2) 1-2 tahun (3) 2-5 tahun (4) 5-10 tahun (5) > 10 tahun
- S15 **Berapa jumlah anggota keluarga yang merokok dalam satu tempat tinggal :**
..... orang
- S16 **Apakah Anda mengkonsumsi makanan yang dibakar atau panggang? (contohnya sate, daging panggang, steak, ayam / daging bakar, jagung bakar, dll)**
(1) Sering (minimal 1 porsi per minggu) (2) Kadang-kadang (\leq 3 porsi sebulan)
- S17 **Apakah Anda mengonsumsi minuman beralkohol ?**
(1) Sering (2) Kadang-kadang (3) Tidak pernah
- S18 **Apakah Anda mengonsumsi obat-obatan ?**
(1) Sering (2) Kadang-kadang (3) Tidak pernah
- S19 **Apakah Anda mengonsumsi minuman ringan (bersoda) ?**
(1) Sering (2) Kadang-kadang (3) Tidak pernah

Tanda tangan,

(.....)
Pewawancara

(.....)
Responden



LEMBAR ANGGKET

NO. SAMPEL

Dengan hormat, bersama ini saya mohon kesediaan Anda untuk mengisi lembar angket ini sesuai dengan keadaan yang sebenarnya. Jawaban yang Anda berikan pada formulir ini akan digunakan untuk penelitian mengenai "Studi Deteksi Senyawa 8-Hidroksi-2'-Deoksiguanosin (8-OHdG) Sebagai Biomarker Genotoksitas". Silakan jawab pertanyaan sebaik yang Anda bisa. Jika ada yang tidak dimengerti, jangan ragu untuk menanyakannya pada saya. Atas kerjasamanya pada penelitian ini, saya ucapkan terima kasih.

Sampel : Pasien Penderita Kanker
 Sampel nomor :
 Tanggal pengambilan sampel :
 Waktu pengambilan sampel :
 Cara pengisian : Wawancara

DATA RESPONDEN

Nama responden :
 Jenis kelamin : Pria/Wanita*
 Usia : tahun

* coret yang tidak perlu

Catatan : beri tanda silang (X) pada pilihan

(Pertanyaan S1 - S5 berdasarkan keterangan dari Dokter yang menangani Pasien)

RIWAYAT PENYAKIT

- S1 Stadium Kanker :
 (1) Stadium I (2) Stadium II 3) Stadium III (4) Stadium IV
- S2 Jenis kanker yang diderita :
- S3 Apakah pasien sudah menjalani kemoterapi ? Ya / Tidak *
 Jika ya, lanjutkan ke S4, sedangkan jika tidak langsung ke S5.
- S4 Jika pasien telah menjalani kemoterapi, lama menjalani kemoterapi :
 (1) < 1 tahun (2) 1-2 tahun (3) > 2 tahun
- S5 Apakah pasien menderita gangguan pernapasan lain ? (Misal : radang paru, asma, dll)
 (1) Sering (2) Kadang-kadang (3) Tidak pernah
 Gangguan pernapasan yang dialami :

(Pertanyaan S6 - S16 berdasarkan keterangan dari Pasien)

RIWAYAT PEKERJAAN

- S6 Riwayat Pekerjaan :
 Pekerjaan :
 Lama bekerja : tahun
 Waktu bekerja : jam per hari
 Frekuensi bekerja : hari per minggu
- S7 Penggunaan masker saat bekerja :
 (1) Sering (2) Kadang-kadang (3) Tidak pernah
- S8 Transportasi yang Anda gunakan untuk mencapai tempat kerja :

