

PENGARUH SUDUT KEMIRINGAN TABUNG KULTUR TERHADAP NILAI *NUCLEAR DIVISION INDEX* (NDI) KULTUR DARAH TEPI MANUSIA

Sofiati P¹, Diah A.L², Viria A.S¹, D Ramadhani^{1*}

¹*Pusat Teknologi Keselamatan dan Metrologi Radiasi (PTKMR), Badan Tenaga Nuklir Nasional (BATAN), Jl. Lebak Bulus Raya No. 49, Jakarta 12440*

²*Departemen Biologi, Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam (MIPA), Universitas Negeri Jakarta (UNJ), Jl. Rawamangun Muka, Rawamangun, Jakarta Timur 13220*

*Email: ipungsp@batan.go.id

Abstrak

Sampel darah tepi secara umum dikultur dalam tabung sentrifus untuk analisis sitogenetik serta proses sitogenetik biosimetri. Untuk meningkatkan luas area permukaan pada proses pertukaran gas dalam tabung kultur, tabung umumnya diposisikan pada sudut kemiringan tertentu dalam inkubator. Tujuan penelitian adalah mengetahui pengaruh sudut kemiringan tabung sentrifus dalam inkubator terhadap tingkat proliferasi sel limfosit darah tepi manusia. Sampel darah tepi dari tiga orang donor dikultur dalam media pertumbuhan kemudian diletakkan pada inkubator suhu 37°C dengan variasi tiga sudut kemiringan yang berbeda yaitu 30, 45 dan 60° selama 72 jam. Selanjutnya dilakukan proses pemanenan, preparasi preparat dan pengamatan dengan mikroskop. Nilai Nuclear Division Index (NDI) dari setiap sudut kemiringan tabung pada seluruh donor kemudian dihitung dan dibandingkan untuk mengetahui sudut optimal yang memberikan nilai NDI paling tinggi. Hasil analisis statistik memperlihatkan bahwa tidak terdapat perbedaan secara statistik pada nilai NDI dari ketiga sudut kemiringan yang digunakan ($p > 0,05$). Berdasarkan hasil penelitian dapat disimpulkan bahwa ketiga sudut kemiringan tabung dalam inkubator yang digunakan tidak memengaruhi tingkat proliferasi sel limfosit darah tepi manusia.

Kata kunci: *Biosimetri, Darah, Mikronukleus, Nuclear Division Index*

1. PENDAHULUAN

Teknik uji *cytokinesis block micronucleus* (CBMN) pada sel limfosit darah tepi telah digunakan sejak tahun 1985 di banyak laboratorium sebagai metode optimal untuk mengevaluasi efek genotoksisitas dan dalam proses biosimetri. Penggunaan limfosit darah tepi dalam teknik uji CBMN memiliki kelebihan tersendiri yaitu mudah diperoleh serta dapat dilakukan secara *in vitro*. Teknik uji CBMN telah dikembangkan dengan baik untuk menginduksi sel limfosit darah tepi dengan mitogen sehingga memungkinkan ekspresi mikronukleus. Mikronukleus adalah patahan (*fragmen*) kromosom yang tidak dapat berinteraksi dengan benang-benang *spindle* pada tahap anafase dalam siklus sel dan membentuk nukleus kecil diluar nukleus utama saat proses sitokinesis (Fenech, 2020). Sampel darah tepi secara umum dikultur dalam tabung sentrifus untuk analisis sitogenetik termasuk pada proses biosimetri. Secara umum tabung diposisikan pada sudut kemiringan tertentu dalam inkubator untuk meningkatkan luas area permukaan pada proses pertukaran gas dalam tabung kultur. Berdasarkan *International Atomic Energy Agency* (IAEA) (2011) sudut kemiringan yang umum digunakan pada kultur uji CBMN adalah 45°, sedangkan sudut kemiringan yang digunakan pada Laboratorium Sitogenetik Pusat Teknologi Keselamatan dan Metrologi Radiasi – Badan Tenaga Nuklir Nasional (PTKMR – BATAN) adalah sebesar 30°.

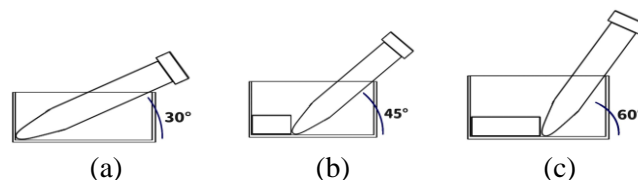
Nuclear Division Index (NDI) adalah indeks yang memberikan informasi mengenai status pembelahan sel dan dapat digunakan untuk mengevaluasi perkembangan siklus sel limfosit setelah stimulasi senyawa mitogenik (IAEA, 2011). Nilai NDI diperoleh dengan cara menghitung proporsi sel mononukleus (sel dengan satu nukleus), sel binukleus (sel dengan dua nukleus), dan sel multinukleus (sel dengan lebih dari 2 nukleus). Nilai NDI dapat digunakan sebagai biomarker dalam beberapa penyakit. Sebagai contoh nilai NDI dapat digunakan untuk penanda dalam *screening* kanker paru-paru pada perokok dan untuk kanker kolorektal (El Zein *et al.*, 2008 ; Ionescu *et al.*, 2011). Selain itu, NDI juga digunakan sebagai penanda penyakit ginjal kronis

(Mamur *et al.*, 2019). Secara umum hasil penelitian memperlihatkan bahwa nilai NDI pada kelompok penyakit kanker dan ginjal kronis lebih rendah secara signifikan dibandingkan kelompok kontrol. Hipotesis yang dibuat adalah penderita kanker memiliki jumlah sel dengan kerusakan kromosom lebih banyak dan mengalami kematian sel sebelum memasuki proses pembelahan sel. Berdasarkan hipotesis tersebut dapat disimpulkan bahwa kecil kemungkinan sel yang memiliki kerusakan kromosom berpeluang kecil untuk memasuki fase pembelahan sel (Fenech, 2020).

Nilai NDI dapat diperoleh secara langsung pada uji CBMN (IAEA, 2011). Nilai NDI adalah nilai indeks proliferasi untuk mengukur efek sitostatik melalui proporsi sel mono, bi, dan multinukleus (Gajski *et al.*, 2018; Thomas & Fenech, 2011). Kriteria penilaian sel mono, bi, dan multinukleus adalah sel yang memiliki sitoplasma utuh dan memiliki jumlah nukleus masing-masing sebanyak satu, dua, dan tiga atau lebih dalam sel (IAEA, 2011). Nilai NDI terendah adalah 1,0 yang menandakan bahwa semua sel *viable* mengalami kegagalan pembelahan, sehingga seluruh sel menjadi mononukleus. Apabila seluruh sel *viable* mengalami pembelahan sel maka keseluruhan sel akan memiliki dua nukleus dan menjadi sel binukleus serta nilai NDI adalah sebesar 2,0. Nilai NDI lebih dari 2,0 mengindikasikan bahwa terdapat beberapa sel yang telah menyelesaikan lebih dari satu siklus pembelahan (Fenech, 2007). Untuk mendapatkan nilai NDI yang optimal, maka dilakukan evaluasi terhadap sudut kemiringan tabung sentrifus dalam inkubator terhadap tingkat proliferasi sel limfosit darah tepi manusia. Penelitian yang dilakukan bertujuan untuk mengetahui sudut kemiringan tabung sentrifus yang paling optimal terhadap tingkat proliferasi sel limfosit darah tepi manusia.

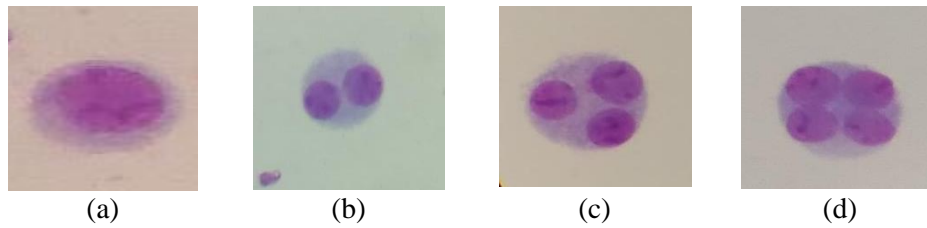
2. METODOLOGI

Sampel darah diperoleh dari tiga orang donor perempuan dengan usia 21 tahun. Sampel darah tepi sebanyak 3 ml dari masing masing donor diambil dan dimasukkan ke dalam tabung *vacutainer* berisi heparin. Sebanyak 0,5 mL sampel darah kemudian dikultur dalam medium yang terdiri dari 4,5 ml *Roswell Park Memorial Institute* (RPMI) yang dilengkapi dengan *L-Glutamine* dan HEPES; 0,8 ml *Fetal Bovine Serum* (FBS); 0,1 ml *Penicillin streptomycin* dan 0,1 ml *Phytohaemagglutinin* (PHA). Tabung kultur kemudian ditempatkan dalam rak tabung dengan tiga sudut kemiringan yang berbeda yaitu 30°, 45°, dan 60°. Tabung kemudian disimpan dalam inkubator 37°C selama 72 jam. Saat waktu inkubasi mencapai 44 jam ditambahkan 15 µL *Cytochalasin-B* kemudian di inkubasi kembali hingga 72 jam.



Gambar 1. Posisi kemiringan tabung kultur dalam inkubator (a) 30° (b) 45° (c) 60°.

Setelah inkubasi kemudian dilakukan proses panen dengan sentrifugasi pada kecepatan 800 rpm. Supernatan yang terbentuk kemudian dibuang, dan endapan ditambahkan larutan KCl 0,075 M 4°C. Selanjutnya dilakukan homogenisasi dan tabung disentrifugasi kembali dengan kecepatan 800 rpm selama 8 menit. Supernatan yang terbentuk dibuang dan ditambahkan larutan *Ringer-Carnoy* serta dilakukan homogenisasi pada tabung. Proses sentrifugasi kembali dilakukan pada kecepatan 800 rpm selama 8 menit dan dilakukan pencucian dengan larutan *Carnoy* hingga diperoleh endapan berwarna putih. Pembuatan preparat dilakukan dengan meneteskan endapan diatas preparat dan kemudian dikeringkan pada suhu ruang. Preparat selanjutnya diwarnai dengan Giemsa 4% dan ditutup dengan *cover glass*. Pengamatan dilakukan dengan menghitung jumlah sel mono, bi dan tri serta tetranukleus dalam 1000 sel. Pengamatan dilakukan dengan menggunakan mikroskop cahaya pada pembesaran 400×.



Gambar 2. Sel mononukleus (a); binukleus (b); trinukleus (c) dan tetranukleus (d) (Dokumentasi Pribadi, 2021)

Perhitungan nilai NDI menggunakan rumus sebagai berikut:

$$NDI = \frac{(M1 + 2M2 + 3M3 + 4M4)}{N}$$

Kode M1, M2, M3, M4 merepresentasikan jumlah sel yang memiliki 1, 2, 3, dan 4 nukleus. Sedangkan N merupakan total jumlah sel hidup yang diberi skor (IAEA, 2011). Uji normalitas data NDI kemudian dilakukan menggunakan uji Shapiro-Wilk. Uji One Way Anova kemudian dilakukan untuk mengetahui signifikansi perbedaan nilai NDI pada ketiga kelompok perlakuan. Analisis statistik dilakukan dengan perangkat lunak IBM SPSS Statistics 25.

3. HASIL DAN PEMBAHASAN

Uji CBMN merupakan salah satu metode sitogenetik untuk mendeteksi ketidakstabilan kromosom (Fenech, 2020). Dalam uji CBMN sel binukleus dapat terbentuk akibat pemberian Cytochalasin-B yang berfungsi untuk memblokir proses sitokinesis sehingga tidak terjadi pembelahan sitoplasma (Thomas & Fenech, 2011). Hasil penelitian memperlihatkan bahwa masih dapat ditemukan sel trinukleus dan tetranukleus. Secara teori, sel trinukleat dan tetranukleat tidak seharusnya ada dalam hasil kultur yang diperoleh, karena pada waktu kultur 44 jam sudah dilakukan penambahan Cytochalasin-B untuk memblokir proses sitokinesis. Menurut Fenech (2020), pada uji CBMN sel-sel yang sudah menyelesaikan pembelahan sel akan teridentifikasi dengan munculnya binukleus (BN) pasca pemberian Cytochalasin-B. Terdapat kemungkinan sel yang memiliki kerusakan pada sentromer dapat mengarah pada pembentukan lebih dari dua kutub mitosis, sehingga menghasilkan lebih dari dua inti. Kemungkinan lainnya adalah terdapat beberapa sel yang berhasil proses pembelahan sel sehingga memiliki tiga atau empat inti. Hingga kini mekanisme molekuler yang mendasari fenomena tersebut belum diketahui secara pasti. Menurut Ionescu *et al.*, (2011), jika beberapa sel yang hidup dapat menyelesaikan lebih dari satu pembelahan inti, maka akan mengandung lebih dari dua inti.

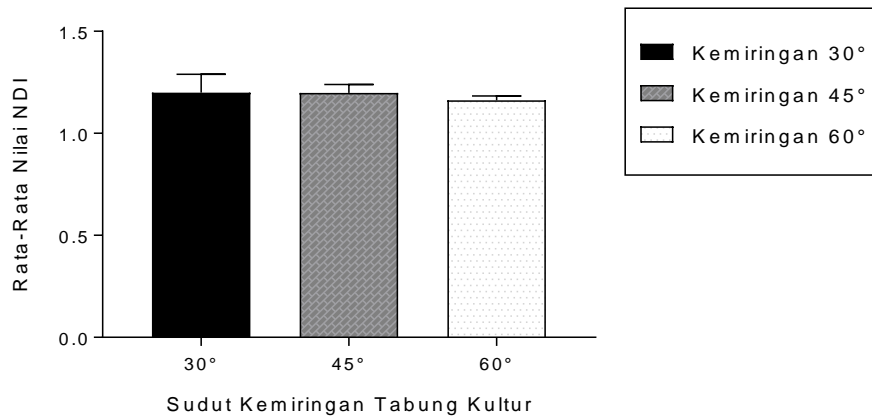
Tabel 1. Jumlah sel mononukleat, binukleat, trinukleat dan tetranukleat untuk menghitung NDI

Kelompok	N	Total M1	Total M2	Total M3	Total M4	Rata rata NDI ±SD
Sudut 30°	9	7555	1205	129	111	1,199 ± 0,09
Sudut 45°	9	7551	1226	114	109	1,197 ± 0,04
Sudut 60°	8	6907	948	86	59	1,162 ± 0,02

Keterangan:

M1 = Sel mononukleus, M2 = sel binukleus, M3 = sel trinukleus, M4 = sel tetranukleus, N = jumlah sampel.

Analisis statistik menunjukkan bahwa tidak terdapat perbedaan nilai rata-rata NDI yang signifikan antara tiga kelompok sudut kemiringan tabung kultur disemua sampel ($p > 0,05$). Hal ini menunjukkan bahwa tidak terdapat pengaruh sudut kemiringan tabung kultur terhadap nilai NDI kultur darah tepi manusia yang dilakukan dalam penelitian ini. Gambar 3 memperlihatkan bahwa rata-rata nilai NDI kurang dari 1,2 dan menurun dengan bertambahnya besar sudut kemiringan tabung kultur. Nilai NDI yang diperoleh masih berada dalam rentang kisaran pada umumnya. Sebuah studi yang dilakukan oleh Teng *et al.*, (2016) pada populasi di Provinsi Anhui, Cina memperlihatkan bahwa rentang NDI yang ditemukan berkisar antara 1,10 hingga 2,36. Berdasarkan hasil penelitian tersebut, maka hasil rata-rata nilai NDI semua sampel (total sampel) yang didapatkan pada penelitian kali ini termasuk rendah yaitu sebesar 1,187.



Gambar 3. Nilai rata-rata NDI pada sudut kemiringan tabung kultur

Rendahnya rata-rata NDI yang ditemukan pada penelitian kemungkinan disebabkan oleh faktor kondisi kultur yang kurang optimal dapat pula menyebabkan rendahnya nilai NDI dan membuat nilai NDI tidak representatif. Menurut IAEA (2011), kultur sel dapat dipengaruhi oleh suhu lingkungan dan kelembaban relatif dalam suatu laboratorium. Selain itu, menurut Fenech (2000), kondisi kultur yang optimal akan menghasilkan 35-60% atau lebih sel binukleus pada 72 jam setelah stimulasi PHA. Pada penelitian ini, proporsi sel binukleat berada pada kisaran 11%-12%. Hal ini menunjukkan bahwa kondisi kultur pada penelitian ini turut memengaruhi rendahnya nilai NDI yang didapat.

4. KESIMPULAN

Hasil penelitian menunjukkan bahwa tidak terdapat perbedaan nilai NDI yang signifikan antara tiga kelompok sudut kemiringan tabung kultur (30°, 45°, dan 60°) disemua sampel ($p > 0,05$). Hal ini berarti tidak terdapat pengaruh sudut kemiringan tabung sentrifus pada kultur darah tepi manusia sebagai salah satu penanda proliferasi sel. Nilai rata-rata NDI yang diperoleh dalam penelitian ini tergolong rendah yaitu $< 1,2$ yang menunjukkan bahwa kualitas proses pembelahan sel limfosit yang dihasilkan tidak maksimal akibat kondisi kultur yang kurang optimal.

DAFTAR PUSTAKA

- El-Zein, R. A., Fenech, M., Lopez, M. S., Spitz, M. R., & Etzel, C. J. (2008). Cytokinesis-blocked micronucleus cytome assay biomarkers identify lung cancer cases amongst smokers. *Cancer Epidemiology and Prevention Biomarkers*, 17(5), 1111-1119.
- Fenech, M. (2000). The in vitro micronucleus technique. *Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis*, 455(1-2), 81-95.
- Fenech, M. (2007). Cytokinesis-block micronucleus cytome assay. *Nature protocols*, 2 (5), 1084.

- Fenech, M. (2020). Cytokinesis-Block Micronucleus Cytome Assay Evolution into a More Comprehensive Method to Measure Chromosomal Instability. *Genes*, *11*(10), 1203.
- Gajski, G., Gerić, M., Oreščanin, V., & Garaj-Vrhovac, V. (2018). Cytokinesis-block micronucleus cytome assay parameters in peripheral blood lymphocytes of the general population: contribution of age, sex, seasonal variations and lifestyle factors. *Ecotoxicology and environmental safety*, *148*, 561-570.
- International Atomic Energy Agency (2011). Cytogetic dosimetry: Applications in preparedness for and response to radiation emergencies. In manual series.
- Ionescu, M. E., Ciocirlan, M., Becheanu, G., Nicolaie, T., Ditescu, C., Teiusanu, A. G., & Diculescu, M. M. (2011). Nuclear division index may predict neoplastic colorectal lesions. *Maedica*, *6*(3), 173.
- Mamur, S., Yuzbasioglu, D., Altok, K., Unal, F., & Deger, S. M. (2019). Determination of genotoxic effects in hemodialysis patients with chronic kidney disease and the role of diabetes mellitus and other biochemical parameters. *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*, *844*, 46-53.
- Teng, J. J., Yang, T. J., Ye, L., Feng, X. Q., Zheng, Y. X., & Duan, H. W. (2016). Analysis on the nuclear division index of peripheral blood lymphocytes in the 281 general population of Anhui, China. *Zhonghua yu Fang yi xue za zhi [Chinese Journal of Preventive Medicine]*, *50*(5), 429-433.
- Thomas, P., & Fenech, M. (2011). Cytokinesis-block micronucleus cytome assay in lymphocytes. In *DNA Damage Detection In Situ, Ex Vivo, and In Vivo* (pp. 217-234). Humana Press, Totowa, NJ.