

## **BAB IV**

### **METODOLOGI**

#### **IV.1 Rancangan Penelitian**

Desain penelitian adalah penelitian deskriptif observasional dengan menggunakan pendekatan potong lintang (*cross sectional*). Bidang penelitian adalah sitogenetik dan genetika molekuler.

#### **IV.2 Tempat dan Waktu Penelitian**

Penelitian dilaksanakan di Laboratorium *Center for Biomedical Research* (CEBIOR) Fakultas Kedokteran Universitas Diponegoro Semarang, Laboratorium Radiobiologi Pusat Teknologi Keselamatan dan Metrologi Radiasi (PTKMR), Badan Tenaga Nuklir Nasional (BATAN), Jakarta. Penelitian dilakukan selama 3 bulan yaitu pada bulan November 2015 hingga Januari 2016.

#### **IV.3 Sampel Penelitian**

Sampel penelitian adalah pekerja radiasi Pusat Reaktor Serba Guna (PRSG), BATAN yang memenuhi kriteria inklusi dan eksklusi sebagai berikut.

##### **1) Kriteria Inklusi**

- Memiliki masa kerja minimal 10 tahun baik pria maupun wanita dan berasal dari bidang operasi reaktor.
- Tidak sedang mendapatkan pengobatan tertentu terutama radioterapi
- Memiliki catatan penerimaan dosis selama 3 bulan terakhir

##### **2) Kriteria Eksklusi**

- Tidak bersedia ikut dalam penelitian sebagai sampel penelitian

- Pernah mendapatkan paparan radiasi pengion berlebih saat melakukan pekerjaan maupun saat melakukan pengobatan

Sampel terdiri dari subjek kelompok pekerja radiasi dan kelompok kontrol.

Sampel kontrol kasus yang dipilih berdasarkan kriteria inklusi dan eksklusi sebagai berikut.

### 3) Kriteria Inklusi Sampel Kontrol

- Pekerja Non Radiasi yang sehat dan bersedia menandatangani *informed consent*.

### 4) Kriteria Eklusi Sampel Kontrol

- Memiliki riwayat terpapar radiasi pengion pada masa lampau
- Sedang mendapatkan pengobatan tertentu terutama radioterapi

## IV.4 Besar Sampel

Tingkat kemaknaan yang digunakan untuk menerima atau menolak hipotesis adalah  $\alpha = 0,05$  ( $z = 1,96$ ),  $\beta = 10\%$ , *power* 90% ( $z = 1,282$ ) serta perkiraan perbedaan klinis frekuensi mikronukleus ( $d$ ) sebesar 1,76 mikronukleus persel dan simpang baku frekuensi mikronukleus pada pekerja radiasi sebesar 2,80 mikronukleus per sel yang didasarkan pada penelitian Angelini S *et al.* dalam “Micronuclei in humans induced by exposure to low level of ionizing radiation: influence of polymorphisms in DNA repair genes” dari Mutation Research 570, December 10, 2005 maka perhitungan besar sampel minimal yang digunakan adalah sebagai berikut.

$$n = \left[ \frac{(z_{\alpha} + z_{\beta})s}{d} \right]^2$$

$n$  = jumlah sampel keseluruhan

$s$  = simpang baku frekuensi mikronukleus pada pekerja radiasi

$z$  = tingkat kemaknaan = 0,05 ( $z = 1,96$ )

$z$  = power 90% ( $z = 1,282$ )

maka  $n = 26,6 \approx 27$  sampel. Kemungkinan terjadi *drop out* sebesar 10%, sehingga besar sampel keseluruhan minimal adalah 30 sampel pada kelompok pekerja radiasi dan 30 sampel kelompok kontrol.

#### **IV.5 Cara Kerja**

Sampel penelitian yang memenuhi kriteria inklusi diberikan penjelasan mengenai prosedur penelitian, keuntungan dan kerugian mengikuti penelitian. Setelah mendapat penjelasan secara lengkap tentang prosedur penelitian sampel diminta untuk mengisi formulir kesediaan untuk mengikuti penelitian (*informed consent*). Sebanyak 10 mL darah tepi diambil dari vena kubiti untuk kemudian digunakan pada uji mikronukleus dan dilakukan ekstraksi DNA dari darah tersebut.

##### **IV.5.1 Teknik Uji Mikronukleus**

Sebanyak 0,5 mL sampel darah dibiakan (dikultur) dalam tabung sentrifus 15 mL yang telah berisi media pertumbuhan 4,5 ml RPMI (*Roswell Park Memorial Institute*) dilengkapi dengan HEPES serta *L-Glutamine*, 15% *Fetal Bovine Serum*, 100  $\mu$ L *Penicillin Streptomycin* dan 100  $\mu$ L *Phytohaemagglutinin* (PHA). Tabung kemudian ditutup dan diinkubasi dalam inkubator dengan konsentrasi CO<sub>2</sub> sebesar 5% dan suhu 37°C. *Cytochalasin-B* (6  $\mu$ g/mL) ditambahkan sebanyak 15  $\mu$ L pada

waktu 44 jam setelah penambahan PHA. Tabung kemudian disimpan kembali dalam inkubator selama 28 jam. Setelah 72 jam tabung kemudian disentrifus dengan kecepatan 800 rpm selama 10 menit. Pada endapan darah ditambahkan 6 ml KCL 0,075 M 4°C dan disentrifus 800 rpm selama 8 menit. Selanjutnya endapan ditambahkan 5 ml larutan fiksatif (metanol : asam asetat = 10 : 1) yang dicampur dengan *ringer solutions* dengan perbandingan 1 : 1 kemudian disentrifus 800 rpm selama 8 menit. Pada endapan ditambahkan 5 ml larutan fiksatif dan disentrifus 800 rpm 8 menit. Diulangi langkah penambahan larutan fiksatif dan disentrifus kembali sampai diperoleh supernatan yang jernih dan endapan limfosit berwarna putih dan disimpan selama satu malam. Sebelum dilakukan pembuatan preparat, tabung disentrifus dengan kecepatan 800 rpm selama 8 menit dan supernatan dibuang hingga tersisa kira-kira 1 cm endapan dengan supernatan dan diaduk perlahan dengan pipet. Diambil sebanyak 40 µL endapan limfosit kemudian diteteskan di atas gelas objek dengan mikropipet dan dikeringkan pada suhu ruang selama satu malam. Preparat selanjutnya diwarnai dengan Giemsa 4% selama 10 menit dan ditutup dengan *cover glass* dan entellan. Preparat diamati di bawah mikroskop dengan perbesaran 400 kali oleh penulis seorang untuk menghindari perbedaan jumlah mikronukleus yang ditemukan. Satu atau hingga tiga preparat dari tiap sampel diamati hingga jumlah sel binukleus yang dihitung mencapai 1000 sel. Apabila dari satu preparat telah ditemukan 1000 sel binukleus, maka diulangi proses pengamatan dengan

menggunakan preparat lainnya untuk memastikan jumlah mikronukleus dalam 1000 sel binukleus. Proses pengamatan preparat dilakukan secara zig-zag di bawah mikroskop. Penghitungan frekuensi mikronukleus dilakukan dengan membagi jumlah mikronukleus dalam 1000 sel binukleus. Kriteria dalam memilih sel binukleus yang diamati adalah sebagai berikut.

- Sel harus memiliki dua nukleus dan kedua nukleus memiliki membran inti yang jelas serta berada dalam sitoplasma yang sama.
- Kedua nukleus memiliki ukuran dan intensitas warna yang serupa.
- Kedua nukleus dapat terhubung atau tidak oleh *nucleoplasmic bridges* dengan panjang tidak lebih dari seperempat rerata diameter kedua nukleus.
- Kedua nukleus dapat bersinggungan akan tetapi sebaiknya tidak saling tumpang tindih, apabila tumpang tindih bisa diamati apabila batas antara kedua nukleus dapat dibedakan dengan jelas.
- Batas sitoplasma sel binukleus dapat dibedakan secara jelas dengan batas sel binukleus lain yang berdekatan

Sedangkan kriteria mikronukleus yang dapat diamati antara lain adalah.

- Diameter MN pada sel limfosit umumnya berkisar antara  $1/16$  atau  $1/3$  dari rerata diameter kedua nukleus utama.
- Dapat dengan mudah dibedakan dengan partikel pewarna giemsa (artifak).
- Tidak terhubung dengan nukleus utama.

- Mikronukleus dapat bersinggungan dengan nukleus utama tetapi tidak tumpang tindih dengan nukleus utama.
- Mikronukleus memiliki intensitas warna yang sama dengan nukleus utama.

#### **IV.5.2 Ekstraksi DNA**

Ekstraksi DNA dilakukan dengan menggunakan QIAGEN *kit* ekstraksi DNA. Secara singkat proses ekstraksi DNA dilakukan dengan mencampurkan 20  $\mu$ l QIAGEN Protease atau proteinase K dengan 200  $\mu$ l sampel darah dan 200  $\mu$ l Buffer AL. Campuran kemudian dihomogenkan dengan menggunakan vortex selama 15 detik. Selanjutnya campuran diinkubasi selama 10 menit pada suhu 56°C dan ditambahkan 200  $\mu$ l ethanol (96-100%). Campuran kemudian dipindahkan ke QIAamp Mini Spin Column (dalam 2 ml *tube collection*) dan disentrifus pada 8000 rpm selama 1 menit. Selanjutnya QIAamp Mini Spin Column dipindahkan dalam 2 ml *tube collection* baru dan ditambahkan 500  $\mu$ l Buffer AW1 kemudian disentrifus pada 8000 rpm selama 1 menit. QIAamp Mini Spin Column selanjutnya dipindahkan kedalam 2 ml *tube collection* baru dan ditambahkan 500  $\mu$ l Buffer AW2 kemudian disentrifus pada 14.000 rpm selama 3 menit. Kemudian ditambahkan 200  $\mu$ l Buffer AE dan diinkubasi selama 1 menit pada suhu ruang (15-25°C).

#### **IV.5.3 Kuantifikasi DNA**

Kuantifikasi DNA dilakukan dengan menggunakan Qubit Fluorometric Quantification.

#### IV.5.4 Pemeriksaan C18067T gen XRCC3

- PCR-RFLP

Regio spesifik yang mengandung polimorfisme yang dicari akan diamplifikasi menggunakan PCR. Sekuens primer yang digunakan adalah 5'- GGT CGA GTG ACA GTC CAA AC-3' untuk *forward primer* and 5'- CTA CCC GCA GGA GCC GGA GG -3' untuk *reverse primer*. Posisi primer dalam sekuens gen dapat dilihat pada lampiran 1. Reaksi PCR dan kondisi siklus termal dijelaskan dalam tabel IV.1 berikut.

Reagen PCR	Volume
PCR Master Mix	10 $\mu$ L
Forward Primer (0,5 $\mu$ M)	5 $\mu$ L
Reverse Primer (0,5 $\mu$ M)	5 $\mu$ L
DNA (50 ng)	5 $\mu$ L
<b>Volume Final</b>	25 $\mu$ L
Kondisi siklus	95°C – 10 menit 95°C – 1 menit 60°C – 1 menit 72°C – 1 menit 72°C – 10 menit <span style="font-size: 2em; vertical-align: middle;">} 30 X</span>
Besar produk PCR	415 bp

Setelah melalui tahap PCR, produk PCR kemudian dijalankan pada 2% gel agarose untuk mengidentifikasi produk PCR dengan menggunakan marker DNA sebesar 100 bp. Enzim restriksi yang digunakan adalah *NlaIII* yang memotong di *recognition site* CATG<sup>^</sup>. Campuran enzim restriksi dibuat dalam total volume 5  $\mu$ l (0,5  $\mu$ l enzim, 1,5  $\mu$ l *buffer* dan 3  $\mu$ l air distilasi). Campuran tersebut kemudian

ditambahkan dengan 10 µl produk PCR dan diinkubasi dalam suhu 37°C selama satu malam. Produk yang telah dicerna dengan enzim *NlaIII* kemudian dijalankan pada 0,8% gel agarose.

- Hasil genotip

*Gel Doc* (Bio-Rad Laboratories®) digunakan untuk melihat pola jalur pita yang berbeda untuk masing-masing alel. Pola jalur untuk genotip CC adalah 274 bp dan 141 bp; untuk genotip CT adalah 274 bp, 170 bp, 141 bp, 104 bp; dan 170 bp, 141 bp, 104 bp untuk genotip TT.<sup>25</sup> Marker DNA yang digunakan adalah sebesar 50 bp. Gel elektroforesis PCR-RFLP seperti gambar pada lampiran 2.

#### IV.6 Variabel

##### Variabel Bebas

Variabel bebas dalam penelitian ini adalah paparan radiasi pengion

##### Variabel Terikat

1. Frekuensi alel polimorfisme gen *XRCC3* T241M (alel T dan alel C) pada pekerja radiasi  
Skala : Nominal
2. Frekuensi genotip polimorfisme gen *XRCC3* T241M (genotip CC, CT dan TT) pada pekerja radiasi dan kelompok kontrol  
Skala : Nominal
3. Frekuensi mikronukleus pada pekerja radiasi dan kelompok kontrol  
Skala : Nominal



#### IV.7 Definisi Operasional

1. Radiasi Pengion : Radiasi yang dapat mengionisasi atom-atom atau materi yang dilaluinya.
2. Polimorfisme *XRCC3* T241M : Perubahan basa C menjadi T pada kodon 241 gen *XRCC3* sehingga terjadi perubahan dari ACG yang mengkode asam amino *threonine* (Thr) menjadi ATG pengkode asam amino *methionine* (Met).
3. Mikronukleus : Fragmen kecil dari nukleus yang memiliki membran tersendiri dan merupakan representasi dari kerusakan kromosom saat pembelahan sel.
4. Frekuensi Mikronukleus : Nilai pembagian jumlah mikronukleus dengan seribu yang merepresentasikan jumlah sel binukleus yang diamati dari setiap sampel.

#### IV.8 Pengolahan dan Analisis Data

Data yang diperoleh meliputi frekuensi mikronukleus serta data hasil pemeriksaan polimorfisme T241M gen *XRCC3* pada pekerja radiasi dan kelompok kontrol dianalisis dengan menggunakan SPSS 22 dan *MedCalc* 12. Uji non parametrik Mann-Whitney dilakukan untuk mengetahui signifikansi perbedaan frekuensi mikronukleus pada pekerja radiasi dibandingkan dengan kelompok kontrol karena data berdistribusi tidak normal walaupun telah dilakukan transformasi data. Penghitungan nilai rasio prevalensi dari polimorfisme T241M gen *XRCC3* dilakukan berdasarkan data distribusi polimorfisme T241M gen *XRCC3*.

#### IV.9 Alur Penelitian

