

**DETEKSI MUTASI GEN *Parp-1* PADA MENCIT BALB/c YANG
DIPAPAR FORMALIN MENGGUNAKAN PROBE STS 4 *Parp-1***

SKRIPSI

UNIVERSITAS BRAWIJAYA

oleh :

MIRANTI ARDHINI

0510910039-91



JURUSAN BIOLOGI
FAKULTAS MATEMATIKA DAN ILMU PENGETAHUAN ALAM
UNIVERSITAS BRAWIJAYA
MALANG
2009

**DETEKSI MUTASI GEN *Parp-1* PADA MENCIT BALB/c YANG
DIPAPAR FORMALIN MENGGUNAKAN PROBE STS 4 *Parp-1***

SKRIPSI

Sebagai salah satu syarat untuk memperoleh gelar
Sarjana Sains dalam bidang biologi

oleh :
MIRANTI ARDHINI
0510910039-91



JURUSAN BIOLOGI
FAKULTAS MATEMATIKA DAN ILMU PENGETAHUAN ALAM
UNIVERSITAS BRAWIJAYA
MALANG
2009

LEMBAR PENGESAHAN SKRIPSI

**DETEKSI MUTASI GEN *Parp-1* PADA MENCIT BALB/c YANG
DIPAPAR FORMALIN MENGGUNAKAN PROBE STS 4 *Parp-1***

oleh :

MIRANTI ARDHINI

0510910039-91

**Setelah dipertahankan di depan Majelis Pengaji
pada tanggal 29 Oktober 2009**

**dan dinyatakan memenuhi syarat untuk memperoleh gelar
Sarjana Sains dalam bidang biologi**

Pembimbing I

**Dr. Sri Widyarti, M.Si
NIP. 19670525-199103-2**

Pembimbing II

**Dra. Fatchiyah, M.Kes, Ph.D
NIP. 19631127-198903-2**

**Mengetahui,
Ketua Jurusan Biologi
Fakultas MIPA Universitas Brawijaya**

Dr. Sri Rahayu, M.Kes

**NIP. 19620528-198701-2
LEMBAR PERNYATAAN**

Saya yang bertanda tangan di bawah ini :

Nama

: Miranti Ardhini

NIM

: 0510910039-91

Jurusan

: Biologi

Penulis skripsi berjudul : Deteksi Mutasi Gen *Parp-1* pada Mencit BALB/c yang Dipapar Formalin Menggunakan *Probe* STS 4 *Parp-1*

Dengan ini menyatakan bahwa :

1. Skripsi ini adalah benar-benar karya saya sendiri, dan bukan hasil plagiat dari karya orang lain. Karya-karya yang tercantum dalam Daftar Pustaka Skripsi ini, semata-mata digunakan sebagai acuan/referensi.
2. Apabila kemudian hari diketahui bahwa isi Skripsi saya merupakan hasil plagiat, maka saya bersedia menanggung akibat hukum dari keadaan tersebut.

Demikian pernyataan ini dibuat dengan segala kesadaran.

Malang, 29 Oktober 2009
Yang menyatakan,

(Miranti Ardhini)
NIM. 0510910039-91

Deteksi Mutasi Gen *Parp-1* pada Mencit BALB/c yang Dipapar Formalin Menggunakan Probe STS 4 *Parp-1*

Miranti Ardhini, Sri Widiyarti, Fatchiyah

Jurusan Biologi, Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam,
Universitas Brawijaya, Malang

Abstrak

Penelitian ini bertujuan untuk mengidentifikasi pengaruh paparan formalin terhadap gen *Parp-1* pada mencit BALB/c dengan menggunakan *probe* STS 4 *Parp-1*. Mencit BALB/c jantan usia 3 bulan dibagi menjadi 3 kelompok dengan perlakuan konsentrasi formalin berbeda (0 mg/kg BB, 2 mg/kg BB, dan 5 mg/kg BB) yang diberikan secara oral selama 3 bulan. Setelah 3 bulan, mencit dibunuh, dibedah dan dilakukan isolasi DNA dari organ hepar, paru dan ginjal. DNA hepar mencit tanpa perlakuan digunakan sebagai *probe*. *Probe* dibuat dari hasil PCR menggunakan primer *forward* (5'-TTTTTAGCTAAAA TAAATGCTAA-3') dan primer *reverse* (5'-GTTGTTGTGGTTGTCCTA-3'), kemudian dilabel dengan biotin-*nick translation*. DNA sampel (50 pg/ μ l) diuji kecocokannya dengan DNA *probe* terlabel biotin (1 pg/ μ l) menggunakan metode *dot blot*. Densitas warna *dot* yang dihasilkan dinilai dengan *Chemidoc Gel/Membran Analyzer*. Tingginya densitas warna *dot* menunjukkan bahwa DNA sampel normal. Densitas warna pada setiap sampel ditransformasi menjadi frekuensi kejadian mutasi (%). Hasil penelitian menunjukkan bahwa formalin berpotensi menyebabkan mutasi gen *Parp-1*. Frekuensi kejadian mutasi pada ginjal, hepar dan paru akibat paparan formalin 2 mg/kg BB serta 5 mg/kg BB berturut-turut sebesar 43%, 37,5% dan 25%, serta 57%, 50% dan 25%, sehingga dapat disimpulkan bahwa ginjal merupakan organ yang paling rentan terhadap paparan formalin 2 mg/kg BB dan 5 mg/kg BB. Peningkatan dosis formalin menjadi 5 mg/kg BB juga diketahui meningkatkan kejadian mutasi gen *Parp-1* pada ginjal dan hepar tetapi tidak pada paru.

Kata kunci: formalin, *Parp-1*, *probe* STS 4 *Parp-1*

Mutation Detection of *Parp-1* Gene in BALB/c Mice that Exposed to Formalin using STS 4 *Parp-1* Probe

Miranti Ardhini, Sri Widiyarti, Fatchiyah

Department of Biology, Faculty of Mathematic and Science
Brawijaya University, Malang

Abstract

The purpose of this study was to identify the effect of formalin exposure to *Parp-1* gene in BALB/c mice using STS 4 *Parp-1* probe. Three-months old male BALB/c mice were divided to 3 groups dosage (0 mg/kg BW, 2 mg/kg BW and 5 mg/kg BW of formalin). Mice were administrated with formalin orally for 3 months. After 3 months, DNA was isolated from liver, lung and kidney. DNA from liver of untreated mice were used as template for PCR to make probe. Forward primer (5'-TTTTAGCTAAAATAATGCTTA A-3') and reverse primer (5'-GTTGTTGTGGTTGTCCTA-3') is used for PCR. Probe was labelled with biotin-nick translation. DNA sample (50 pg/ μ l) were tested with DNA probe-biotin labelled (1 pg/ μ l) using dot blotting method. The colour density of dot blot were analyzed by *Chemidoc Gel/Membran Analyzer*. According to score number, the frequency of mutation were counted. This study showed that formalin was potential causing mutation of *Parp-1* gene. The frequency of mutation in kidney, liver and lung caused by 2 mg/kg BW and 5 mg/kg BW of formalin dosage exposure respectively 43%, 37,5%, 25% and 57%, 50%, 25%, so that we could concluded that kidney was the most susceptible organ to 2 mg/kg BW and 5 mg/kg BW of formalin dosage exposure. Increasing of formalin dosage to 5 mg/kg BW also increasing the frequency of mutation in kidney and liver but not in lung.

Key words: Formalin, *Parp-1*, STS 4 *Parp-1* probe

KATA PENGANTAR

Penggunaan formalin di Indonesia banyak disalahgunakan sebagai pengawet makanan, padahal formalin memiliki efek mutagenik dan karsinogenik yang berbahaya bagi manusia. Poly (ADP-ribose) polymerase-1 (PARP-1) merupakan enzim utama yang berperan dalam proses perbaikan DNA. Aberasi gen *Parp-1* dapat menyebabkan *single nucleotide polymorphism* (SNP) yang berimplikasi dengan kerentanan terhadap kanker dan mampu mengurangi aktivitas enzimatik dari PARP-1. *Single Nucleotide Polymorphism* dapat dideteksi menggunakan *probe* hasil PCR menggunakan primer *Sequence Tagged Site 4* (STS 4) *Parp-1* karena STS 4 *Parp-1* memiliki ukuran produk PCR terpanjang dibanding STS lainnya. Penelitian ini bertujuan untuk mengidentifikasi pengaruh paparan formalin terhadap gen *Parp-1* pada mencit BALB/c dengan menggunakan *probe* STS 4 *Parp-1*. Hasil penelitian ini diharapkan mampu meyakinkan masyarakat luas tentang dampak negatif mengkonsumsi makanan yang mengandung formalin sehingga masyarakat lebih selektif dalam memilih makanan, memperingatkan produsen makanan untuk bersikap jujur dalam mengelola barang dagangannya agar tidak merugikan kesehatan orang lain serta menegur pemerintah agar bertindak lebih tegas dan waspada dalam mengatur penggunaan formalin sehingga formalin tidak diperdagangkan dengan bebas demi menjaga kesehatan masyarakat Indonesia.

Malang, 29 Oktober 2009

Penulis

UCAPAN TERIMA KASIH

Puji syukur penulis panjatkan kepada Allah SWT atas limpahan rahmat dan hidayah-Nya sehingga skripsi yang berjudul “Deteksi Mutasi Gen *Parp-1* pada Mencit BALB/c yang Dipapar Formalin Menggunakan *Probe STS 4 Parp-1*” dapat penulis selesaikan. Penulis menyadari bahwa skripsi ini tidak akan dapat terselesaikan dengan baik tanpa bantuan dari berbagai pihak. Pada kesempatan ini penulis ingin mengucapkan terima kasih kepada :

1. Dr. Sri Widyarti, M.Si, selaku Pembimbing I dan pembimbing akademik atas bimbingan, pengarahan, kesabaran dan dorongan yang telah diberikan.
2. Dra. Fatchiyah, M.Kes, Ph.D, selaku Pembimbing II atas bimbingan dan dorongan yang telah diberikan.
3. Para Dosen pengajar Jurusan Biologi atas ilmu dan didikan yang telah diberikan.
4. Kedua orang tua yang telah mencurahkan kasih sayang, doa dan pengorbanan hingga penulis dapat menyelesaikan studi.
5. Semua pihak yang tidak dapat penulis sebutkan satu persatu yang telah membantu penyelesaian skripsi ini.

Penulis menyadari bahwa skripsi ini masih jauh dari sempurna, oleh karena itu saran dan kritik yang bersifat membangun penulis harapkan dalam penyempurnaan tulisan ini. Semoga skripsi ini dapat bermanfaat.

Malang, 29 Oktober 2009

Penulis

DAFTAR ISI

	Halaman
LEMBAR PENGESAHAN.....	i
LEMBAR PERNYATAAN	ii
ABSTRAK.....	iii
ABSTRACT	iv
KATA PENGANTAR	v
UCAPAN TERIMA KASIH.....	vi
DAFTAR ISI	vii
DAFTAR GAMBAR.....	ix
DAFTAR TABEL.....	x
DAFTAR LAMPIRAN	xi
DAFTAR SINGKATAN DAN LAMBANG.....	xii
BAB I PENDAHULUAN	
1.1 Latar Belakang	1
1.2 Rumusan Masalah	2
1.3 Tujuan Penelitian.....	3
1.4 Manfaat Penelitian.....	3
BAB II TINJAUAN PUSTAKA	
2.1 Tinjauan Umum tentang Formaldehida.....	4
2.2 Metabolisme Formaldehida	4
2.3 Efek Paparan Formaldehida	6
2.4 Gen <i>Parp-1</i>	6
2.5 <i>Single Nucleotide Polymorphism (SNP)</i> dan <i>Sequence Tagged Site (STS)</i>	7
2.6 Tinjauan Umum tentang <i>Probe</i>	9
2.7 Tinjauan Umum tentang Organ Target	
2.7.1 Hepar	11
2.7.2 Ginjal	12
2.7.3 Paru.....	13
BAB III METODE PENELITIAN	
3.1 Waktu dan Tempat	14
3.2 Cara Kerja	
3.2.1 Perlakuan hewan coba	14
3.2.2 Isolasi DNA menggunakan <i>nucleospin tissue kit</i>	14
3.2.3 Pembuatan <i>probe</i> STS 4 <i>Parp-1</i>	16

3.2.4 Deteksi mutasi gen <i>Parp-1</i> menggunakan <i>probe STS 4 Parp-1</i> terlabel biotin	19
3.2.6 Pengamatan	20
3.2.7 Analisis data	20
BAB IV HASIL DAN PEMBAHASAN	
4.1 Hasil	
4.1.1 Isolasi DNA	21
4.1.2 Pembuatan <i>probe STS 4 Parp-1</i>	
a. <i>Polymerase Chain Reaction (PCR)</i> dan elusi	22
b. Pelabelan biotin- <i>nick translation</i>	23
c. Deteksi mutasi menggunakan <i>probe STS 4 Parp-1</i>	24
4.2 Pembahasan	27
BAB V KESIMPULAN DAN SARAN	
5.1 Kesimpulan	32
5.2 Saran	32
DAFTAR PUSTAKA	33

DAFTAR GAMBAR

Halaman

Gambar 2.1 Metabolisme formaldehida secara normal.....	5
Gambar 2.2 Mekanisme pengenalan <i>probe</i> terhadap DNA Sampel	10
Gambar 2.3 Reaksi kolorimetrik antara biotin dan SA-HRP	11
Gambar 4.1 Hasil isolasi DNA total menggunakan elektroforesis gel agarosa 0,8%	21
Gambar 4.2 Hasil PCR menggunakan gel agarosa 1,5% menghasilkan fragmen DNA 245 bp.....	22
Gambar 4.3 Hasil uji <i>dot blot</i> untuk mengetahui konsentrasi minimal dan terbaik antara DNA <i>probe</i> dan sampel.....	23
Gambar 4.4 Hasil uji <i>dot blot</i> untuk mendeteksi mutasi gen <i>Parp-1</i>	25
Gambar 4.5 Grafik frekuensi kejadian mutasi gen <i>Parp-1</i> pada organ ginjal, hepar, dan paru setelah paparan formalin.....	26

DAFTAR TABEL

Halaman

Tabel 4.1 Penilaian sampel mutasi 26



DAFTAR LAMPIRAN

	Halaman
Lampiran 1. Alur Penelitian	40
Lampiran 2. Urutan Gen <i>Parp-1</i> Mencit (<i>Mus musculus</i>).....	41
Lampiran 3. Data Densitas Warna Hasil <i>Dot blot</i>	44
Lampiran 4. Standar Nilai Acuan Penilaian Mutasi pada Sampel	45
Lampiran 5. Penghitungan Frekuensi Kejadian Mutasi	45
Lampiran 6. Komposisi Bahan.....	46



DAFTAR SINGKATAN DAN LAMBANG

ADP	<i>Adenoside Diphosphate</i>
AEC	<i>Amino Ethyl Carbazole</i>
BB	berat badan
BER	<i>Base Excision Repair</i>
BW	<i>body weight</i>
DNA	<i>Deoxyribonucleic Acid</i>
dNTP	<i>dinucleoside triphosphate</i>
EDTA	<i>Ethylene diamine tetraacetic acid</i>
EtBr	<i>Ethidium Bromide</i>
GSH	glutahion
NAD	<i>Nicotinamide Adenine Dinucleotide</i>
nm	nanometer
PARP	<i>Poly (ADP-ribose) polymerase</i>
PBS	<i>Phosphate Buffer Saline</i>
PCR	<i>Polymerase Chain Reaction</i>
RNA	<i>Ribonucleic Acid</i>
SA-HRP	<i>Streptavidin-Horseradish Peroxidase</i>
SDS	<i>Sodium Dodecyl Sulfate</i>
SNP	<i>Single Nucleotide Polymorphism</i>
SSC	<i>Sodium Saline Citrate</i>
STS	<i>Sequence Tagged Site</i>
TBE	Tris base-Boric acid-EDTA
TE	Tris base-EDTA
A260	nilai absorbansi pada panjang gelombang 260 nm
A280	nilai absorbansi pada panjang gelombang 280 nm
μ l	mikroliter
pg	pikogram
ng	nanogram

BAB I

PENDAHULUAN

1.1 Latar Belakang

Formalin adalah larutan yang terdiri atas formaldehida, air, dan methanol. Formalin umumnya mengandung 37-40% formaldehida, 6-13% methanol, dan sisanya adalah air. Air dalam formalin berfungsi sebagai pelarut formaldehida, sedangkan methanol berfungsi untuk menstabilkan senyawa formaldehida yang secara kimia alami tidak stabil (Anonymous¹, 2008). Jika formalin masuk ke dalam tubuh melalui jalur penelanan (*ingestion*) akan dapat menyebabkan kematian. Hal ini disebabkan formalin bersifat mengiritasi mukosa saluran cerna lambung yang disertai mual, muntah, nyeri, perdarahan, dan perforasi. Jika terpapar secara terus-menerus dapat menyebabkan kerusakan pada hepar, ginjal, dan jantung (Widyaningsih dan Murtini, 2006). Formalin dalam kadar tinggi akan bereaksi secara kimia dengan hampir semua zat dalam sel sehingga menekan fungsi sel dan mengakibatkan kematian sel. Formalin dapat bereaksi dengan asam amino yang menyebabkan protein terdenaturasi (Mulyani, 2003). Formaldehida dapat menyebabkan pembentukan *cross-link* antara DNA dengan protein, DNA *single strand break*, dan menghambat penempelan kembali *single strand break* yang disebabkan radiasi pengionisasi (Grafstorm dkk., 1983).

Kerusakan DNA akan mengaktifkan poly (ADP-ribose) polymerase (PARP) (Jones dkk., 2001). PARP adalah enzim utama yang memediasi langkah penting dalam perbaikan DNA, transkripsi, dan apoptosis (Tulin dkk., 2002). PARP membantu untuk menyiapkan reaksi akut terhadap kerusakan DNA. PARP segera merespon terhadap stres genotoksik dengan cara mengikat ke untai tunggal DNA melalui dua *C-terminal zinc finger*. Pengikatan alosterik ini mengaktifkan enzim, yang menggunakan NAD untuk mensintesis polimer dari ADP-ribose (Boulikas, 1991; D'Amours, 1999). Poly (ADP-ribose) polymerase-1 (PARP-1) adalah enzim inti yang berperan dalam banyak proses biologis tersebut di atas (Poirier dkk., 1982). Mencit *knockout Parp-1* (*Parp-1^{-/-}*) menunjukkan peningkatan kerentanan terhadap karsinogenesis setelah pemberian agen pengalkil, *nitrosamine* dan *azoxymethane* (Masutani dkk., 2005). Hal tersebut menunjukkan bahwa PARP-1 dilibatkan dalam

perbaikan DNA dan ketidakberadaannya dapat menyebabkan peningkatan frekuensi suatu tipe mutasi spesifik. Selain itu, frekuensi DNA yang rusak dapat meningkat di bawah kondisi defisiensi ekspresi gen *Parp-1* (Shibata dkk., 2005). Analisis aberasi *Parp-1* menunjukkan adanya *single nucleotide polymorphism* (SNP) yang berimplikasi dengan kerentanan terhadap kanker, dimana SNP tersebut mampu mengurangi aktivitas enzimatik dari PARP-1 (Shiokawa dkk., 2005; Wang dkk., 2006).

Single nucleotide polymorphism adalah variasi sekuens DNA dimana terdapat perbedaan satu nukleotida tunggal dalam genom di antara anggota spesies. Frekuensi terjadinya tiap polimorfisme sebanyak >1% dalam populasi. Satu alel biasanya lebih umum daripada alel lainnya dan hal tersebut secara tipikal hanya dua alel pada tiap posisi polimorfik (Gregory-Evans dkk., 2007). *Single nucleotide polymorphism* dapat dideteksi dengan menggunakan *probe* (Akey dkk., 2001). *Probe* adalah suatu bagian kecil dari asam nukleat yang telah dilabel dengan isotop radioaktif atau label non-radioaktif (pewarna atau enzim) dan digunakan untuk mendeteksi suatu sekuens nukleotida komplementer atau gen pada asam nukleat target. *Probe* molekuler dapat digunakan untuk menginvestigasi efek modifikasi kimia pada DNA (Gong and Sturla, 2007). *Probe* bersifat lebih sensitif dan lebih spesifik untuk deteksi mutasi dibanding metode PCR konvensional (Tano dkk., 1994).

Single nucleotide polymorphism dapat dideteksi dengan menggunakan *probe* yang spesifik terhadap alel. *Probe* yang digunakan adalah *probe* dengan nukleotida yang komplementer terhadap varian alel dari SNP yang terletak pada posisi tengah dari sekuens *probe*. *Probe* akan berpasangan dengan DNA target yang mengandung SNP pada kondisi dimana hanya *probe* yang berpasangan sempurna dengan hibrid target akan bersifat stabil, sementara hibrid yang mengandung pasangan tidak sempurna bersifat tidak stabil (Syvänen, 2001). Berdasarkan data di atas, maka perlu dilakukan penelitian untuk mengetahui pengaruh paparan formalin terhadap gen *Parp-1*.

1.2 Rumusan Masalah

Masalah yang dirumuskan adalah apakah paparan formalin menyebabkan mutasi gen *Parp-1* pada mencit BALB/c yang dideteksi dengan menggunakan *probe* STS 4 *Parp-1*?

1.3 Tujuan Penelitian

Tujuan penelitian ini adalah untuk mengidentifikasi apakah paparan formalin menyebabkan mutasi gen *Parp-1* pada mencit BALB/c yang dideteksi dengan menggunakan *probe* STS 4 *Parp-1*.

1.4 Manfaat Penelitian

Manfaat yang dapat diperoleh adalah meyakinkan masyarakat tentang dampak negatif mengkonsumsi makanan yang mengandung formalin sehingga masyarakat lebih selektif dalam memilih makanan, memberikan peringatan bagi produsen makanan untuk bersikap jujur dalam mengelola barang dagangannya agar tidak merugikan kesehatan orang lain serta menegur pemerintah agar bertindak lebih tegas dan waspada dalam mengatur penggunaan formalin sehingga formalin tidak diperdagangkan dengan bebas demi menjaga kesehatan masyarakat Indonesia.



BAB II

TINJAUAN PUSTAKA

2.1 Tinjauan Umum tentang Formaldehida

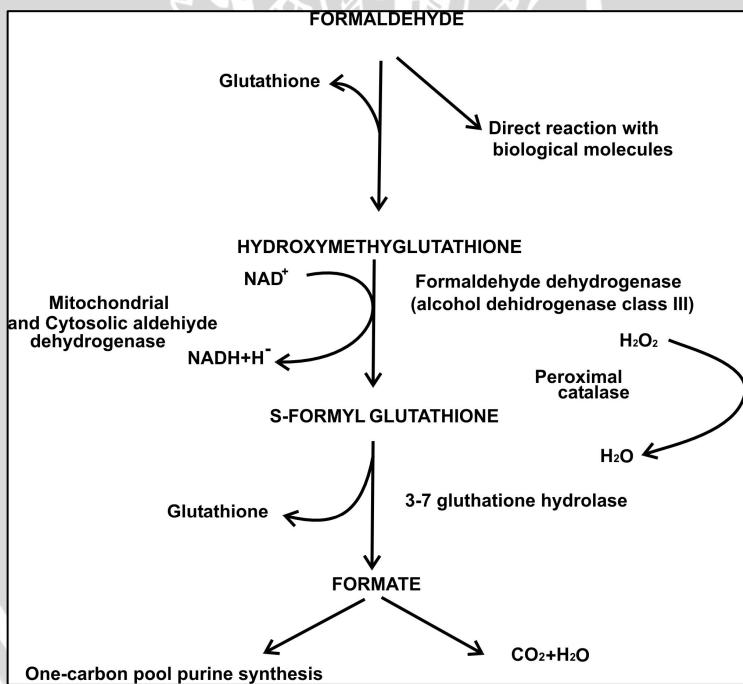
Formaldehida adalah gas tidak berwarna (pada kondisi normal), memiliki bau menyengat dan mudah terbakar. Formaldehida sangat mudah larut dalam air, biasanya dijual sebagai formalin dengan konsentrasi antara 37-55% dalam air, dengan ditambahkan 0,5-15% methanol untuk mencegah polimerisasi menjadi bentuk kristal padat. Formaldehida memiliki batas volume antara 7-73% di udara. Formaldehida juga tersedia sebagai paraformaldehida, yaitu suatu bentuk terpolimerisasi padat. Formula molekuler formaldehida adalah HCHO, dan berat molekulernya adalah 30,03 g/mol. Uap formaldehida lebih berat sekitar 1,03x daripada udara. Larutan formaldehida 37% memiliki tekanan udara sekitar 1,3 mmHg pada 68°F, dan 67-88 mmHg pada 98°F. Tekanan udara formaldehida bergantung pada jumlah methanol yang ditambahkan (Gullickson, 1994).

Agency for Toxic Substances and Disease Registry menyebutkan bahwa formaldehida secara alami dihasilkan dalam jumlah sangat kecil dalam tubuh manusia sebagai bagian normal. Setiap hari formaldehida mengalami metabolisme dan tidak menyebabkan bahaya bagi tubuh. Formaldehida banyak dimanfaatkan dalam produk rumah tangga seperti antiseptik, obat, kosmetik, cairan pencuci piring, pelembut pakaian, pembersih karpet, lem, kertas, plastik, beberapa jenis produk kayu, sebagai pengawet makanan kering dan ikan, sebagai bahan pembuatan cairan pembalsem, serta untuk mengawetkan spesimen jaringan (Anonymous², 1999).

2.2 Metabolisme Formaldehida

Formaldehida adalah hasil antara metabolisme di semua sel, dihasilkan selama metabolisme normal dari serine, glycine, methionine dan choline serta oleh proses demethylasi senyawa N-, S- dan O-methyl. Formaldehida dihasilkan di dalam tubuh melalui proses biokimiawi normal kemudian dioksidasi menjadi format dan atom karbonnya dioksidasi lebih lanjut menjadi karbodioksida atau bergabung dengan purin, thymidine dan asam amino melalui jalur biosintetik *tetrahydrofolate-dependent one-carbon*. Formaldehida

eksogen yang masuk ke dalam tubuh melalui jalur ingestii, saat berada di lumen saluran pencernaan akan menyebar dengan cepat dan meluas di jaringan yang kontak langsung dengan formaldehida. Setelah kontak langsung tersebut, formaldehida akan bereaksi dengan molekul biologis (protein atau asam nukleat) atau mengalami reaksi dengan glutathione, yang kemudian dimetabolisis secara cepat oleh *glutathione-dependent formaldehyde dehydrogenase* dan *S-formylglutathione hydrolase* untuk membentuk format. *Formaldehyde dehydrogenase* terdistribusi secara luas dalam jaringan mamalia. Format selanjutnya akan diekskresikan melalui urin (utamanya sebagai asam format) atau bergabung melalui jalur metabolismik normal ke dalam jalur satu karbon, atau dioksidasi lebih lanjut menjadi karbodioksida dan dikeluarkan melalui pernapasan. Baik formaldehida maupun format tidak terakumulasi secara signifikan dalam tubuh (Anonymous², 1999; Anonymous³, 1995; Anonymous⁴, 2003).



Gambar 2.1 Metabolisme formaldehida secara normal (Anonymous³, 1995)

2.3 Efek Paparan Formaldehida

Menurut *International Programme on Chemical Safety*, penelitian formaldehida akan menyebabkan iritasi dan rasa sakit dalam mulut, kerongkongan, dan saluran pencernaan, selanjutnya terjadi rasa pusing, koma, dan dapat terjadi penurunan suhu tubuh (Anonymous⁵, 1999). Paparan formaldehida secara terus-menerus dapat menyebabkan kerusakan pada hepar, ginjal, dan jantung (Widyaningsih dan Murtini, 2006). *International Agency for Research on Cancer* menyatakan bahwa formaldehida yang diberikan melalui jalur ingesti kepada tikus diketahui menginduksi anomali *micronuclei* dalam saluran gastrointestinal. Formaldehida menginduksi *cross-link* DNA dan protein, *single strand break*, aberasi kromosomal, pertukaran *sister chromatid*, dan mutasi gen pada sel manusia dan sel rodentia *in vitro* (Anonymous³, 1995).

2.4 Gen *Parp-1*

Protein ADP-ribosilasi berperan penting dalam perbaikan DNA, apoptosis, dan transkripsi gen (de Murcia and Shall, 2000; Ziegler and Oei, 2001). Poly (ADP-ribose) polymerase-1 (PARP-1) adalah enzim inti yang berperan dalam banyak proses biologis tersebut (Poirier dkk., 1982). PARP-1 terlibat dalam perbaikan DNA dan pemeliharaan stabilitas genomik, berperan sebagai sensor untuk pemisahan untai DNA dan perekutan protein perbaikan DNA ke tempat kerusakan DNA (Masutani dkk., 2005). PARP-1 akan teraktivasi pada pengikatan untai tunggal DNA melalui *amino-terminal zinc fingers* (Menissier de Murcia dkk., 1997). Protein yang teraktivasi mentransfer ADP-ribose dari NAD ke dalam protein kromatin lokal seperti histon, topoisomerase, polimerase, dan faktor transkripsi. Modifikasi tersebut memfasilitasi *base excision repair* oleh protein transien dari kromosom untuk menunjukkan area yang mengalami kerusakan, melalui mekanisme *down-regulating transcription* dari gen yang dirugikan, dan dengan cara memodulasi aktivitas *checkpoint* dan protein pengatur stres. PARP-1 menjalankan fungsinya dengan cara membentuk kompleks protein dengan faktor transkripsi, protein replikasi, dan efektor *checkpoint* kerusakan DNA (Dantzer dkk., 1998; Pleschke dkk., 2001; Ziegler and Oei, 2001).

Gen *Parp-1* sangat terkonservasi dan terdapat di hampir semua sel eukaryota, mulai dari tumbuhan hingga vertebrata (de Murcia and

Menessier-de Murcia, 1994; Ogura, 1990). Mencit *knockout* *Parp-1* (*Parp-1^{-/-}*) menunjukkan peningkatan kerentanan terhadap karsinogenesis setelah pemberian agen pengalkil, *N-nitrosobis(2-hydroxypropyl)amine* (BHP) dan *azoxymethane* (Masutani dkk., 2005). Hal tersebut menunjukkan bahwa PARP-1 dilibatkan dalam perbaikan DNA dan ketidakberadaannya dapat menyebabkan peningkatan frekuensi suatu tipe mutasi spesifik. Analisis *in vivo* yang dilakukan pada liver mencit *Parp-1^{-/-}* yang diperlakukan dengan BHP menunjukkan bahwa frekuensi mutan dari gen *red/gam* pada mencit *Parp-1^{-/-}* 1,6x lebih tinggi dibanding mencit *Parp-1^{+/-}*. Mencit *Parp-1^{-/-}* juga menunjukkan adanya peningkatan mutasi delesi lebih dari 1 kbp yang disertai dengan insersi atau penyusunan kembali sebanyak 1-5 bp dibandingkan dengan mencit *Parp-1^{+/-}*. Hasil tersebut menyimpulkan bahwa frekuensi kerusakan DNA dapat meningkat di bawah kondisi defisiensi ekspresi gen *Parp-1* (Shibata dkk., 2005).

Disfungsi PARP-1 diketahui terlibat dalam perkembangan *germ cell tumor*. Analisis aberasi gen *Parp-1* pada 16 *germ cell tumor* manusia menunjukkan bahwa terdapat dua *single nucleotide polymorphism* (SNP), Val762Ala dan Lys940Arg. *Single nucleotide polymorphism* pada kedua kasus tersebut mengkode asam amino dalam domain katalitik yang sangat terkonservasi di antara spesies hewan. Perubahan sekuen heterozigot (ATG menjadi ACG) yang menyebabkan substitusi asam amino Met129Thr, diketahui terjadi pada spesimen tumor dan jaringan normalnya. Perubahan basa ini berlokasi pada *second zinc-finger motif* dan merupakan SNP yang jarang atau merupakan mutasi *germline* dari gen *Parp-1*, serta ditemukan pula satu SNP pada intron 2 dan satu SNP pada *upstream 5'-UTR (untranslated region)* (Shiokawa dkk., 2005).

2.5 Single Nucleotide Polymorphism (SNP) dan Sequence Tagged Site (STS)

Single nucleotide polymorphism adalah tipe polimorfisme yang terjadi ketika suatu nukleotida tunggal berubah dan variasi tertentu ditemukan dalam daerah pengkode dan non-pengkode pada DNA (Akey dkk., 2001). Polimorfisme sendiri berarti suatu bentuk variasi genetik yang terdapat dalam suatu populasi (Winnacker, 1987). Polimorfisme juga berarti perbedaan sekuen DNA antara dua

organisme yang berhubungan (Clark, 2005). Polimorfisme gen dapat terjadi karena adanya perubahan nukleotida penyusun DNA pada suatu gen. Polimorfisme gen tersebut dipengaruhi oleh beberapa faktor antara lain mutasi, perkawinan, dan seleksi alam (Brooker, 1999).

Keberadaan SNP dapat merubah sekuens DNA, misalnya dari AAGGCTAA menjadi ATGGCTAA. SNP yang terdapat dalam sekuens pengkode dapat digolongkan sebagai sinonim jika tidak menyebabkan perubahan asam amino atau digolongkan sebagai non-sinonim jika menyebabkan perubahan dalam sekuens asam amino sehingga menghasilkan variasi dalam protein. SNP bersifat penting karena merupakan penanda genetik yang baik, hal ini disebabkan alasan berikut: a) SNP memiliki densitas tinggi dan distribusinya berada di seluruh genom dimana SNP sejati akan memiliki frekuensi alel sekurang-kurangnya 1%; dan b) SNP dapat ditemukan dalam sekuens pengkode maupun non-pengkode, sehingga potensial untuk melihat perubahan fungsi gen yang berasosiasi dengan SNP spesifik (Akey dkk., 2001).

Single nucleotide polymorphism dapat dideteksi dengan *probe* yang berasal dari *Sequence Tagged Site* (STS). Menurut *International Society for Complexity, Information, and Design*, adalah sekuen DNA pendek (antara 200-500 bp) yang memiliki keberadaan tunggal dalam genom serta lokasi dan sekuen basanya diketahui. STS dapat dideteksi dengan menggunakan metode PCR. STS berguna untuk melokalisasi dan mencari pedoman pemetaan dan data sekuen. STS berperan sebagai *landmark* dalam pengembangan *physical map* suatu genom. Ketika *loci* STS mengandung *DNA length polymorphism* maka STS tersebut menjadi penanda genetik berharga. Keuntungan utama dari *loci* STS terletak pada kecepatan analisisnya, dimana STS dapat dianalisis segera setelah pasangan primer PCR diidentifikasi. *Loci* STS dapat dianalisis sebagai penanda genetik kodominan dan dapat digunakan untuk mempelajari hubungan kekerabatan spesies (Anonymous⁶, 2005).

Gen *Parp-1* mencit (*Mus musculus*) memiliki 4 STS. STS 4 terletak pada exon 23. STS 4 merupakan STS yang memiliki ukuran produk PCR terpanjang dibanding STS lainnya, yaitu 245 bp, sehingga diharapkan penggunaan primer STS 4 mampu menghasilkan produk amplifikasi yang lebih spesifik. Urutan gen *Parp-1* mencit (*Mus musculus*) memiliki homologi yang cukup tinggi

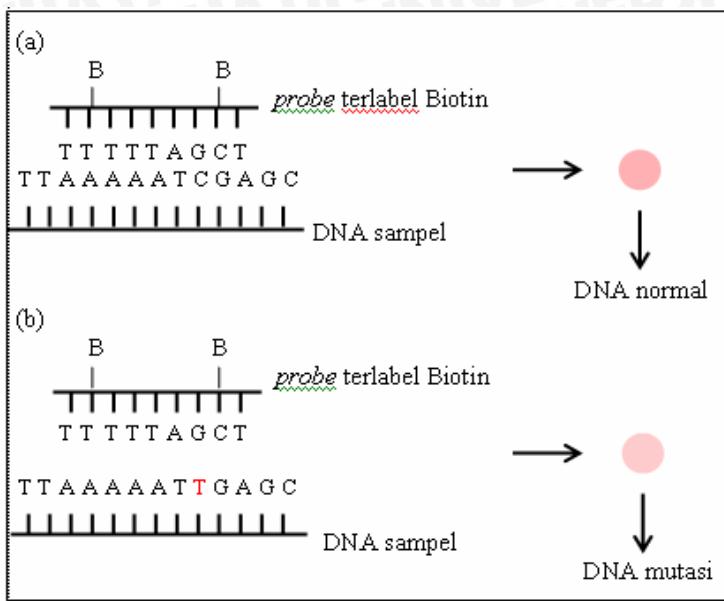
dengan urutan gen *Parp-1* manusia (*Homo sapiens*). Hal tersebut dapat dijadikan acuan bahwa apa yang terjadi pada gen *Parp-1* mencit setelah pemberian formalin kronis dapat pula terjadi pada gen *Parp-1* manusia, sehingga manusia lebih berhati-hati agar tidak mengkonsumsi makanan yang berpengawet formalin.

2.6 Tinjauan Umum tentang *Probe*

Molekul *probe* adalah molekul yang dilabel dengan beberapa cara (biasanya radioaktif atau non-radioaktif) dan digunakan untuk mengikat dan mendeteksi molekul lainnya. *Probe* hibridisasi adalah fragmen DNA atau RNA dengan panjang bervariasi (biasanya 100-1000 basa), yang digunakan untuk mendeteksi keberadaan sekuen nukleotida dalam sampel DNA atau RNA yang komplementer terhadap sekuen pada *probe*. *Probe* berhibridisasi dengan asam nukleat untai tunggal (DNA atau RNA) yang sekuen basanya memungkinkan pemasangan basa antara *probe* dengan target. *Probe* terlabel didenaturasi (melalui pemanasan atau diperlakukan di bawah kondisi alkali) menjadi DNA untai tunggal dan kemudian dihibridisasi dengan DNA target (melalui proses *Southern blotting*) atau RNA target (melalui proses *Northern blotting*) yang tidak bergerak pada suatu membran (Clark, 2005).

Uji DNA *probe* saat ini muncul sebagai salah satu teknologi genomik inti karena uji ini dapat memperoleh hasil dengan cepat dan akurat dalam analisis genom, meliputi pemantauan ekspresi gen, deteksi mutasi, dan analisis *single nucleotide polymorphism* (Lipshutz, dkk., 1999). *Probe* hibridisasi digunakan untuk deteksi dan kuantitasi DNA. *Probe* menyediakan spesifikasi maksimum untuk identifikasi produk. *Probe* yang biasa digunakan adalah *probe* oligonukleotida spesifik yang dilabel dengan pewarna berbeda. Sekuen *probe* dapat berhibridisasi dengan sekuen target pada fragmen DNA yang teramplifikasi (Melcher, 2008).

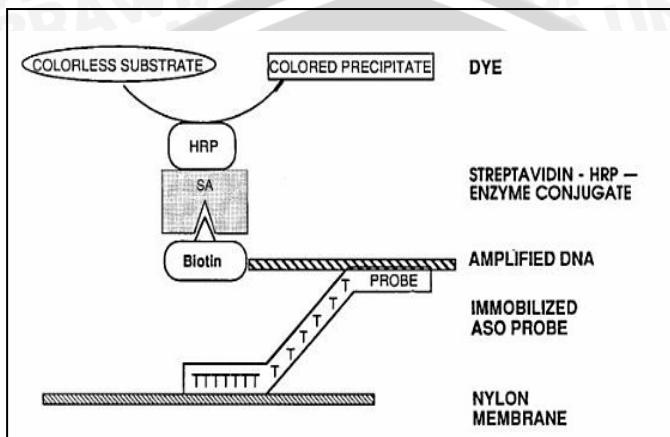
Probe yang digunakan dalam mendeteksi SNP adalah *probe* dengan nukleotida yang komplementer terhadap varian alel dari SNP yang terletak pada posisi tengah dari sekuen *probe*. *Probe* akan berpasangan dengan DNA target yang mengandung SNP pada kondisi dimana hanya *probe* yang berpasangan sempurna dengan hibrid target akan bersifat stabil, sementara hibrid yang mengandung pasangan tidak sempurna bersifat tidak stabil (Syvänen, 2001).



Gambar 2.2 Mekanisme pengenalan *probe* terhadap DNA sampel jika (a) *probe* mengenali DNA sampel; (b) *probe* tidak mengenali DNA sampel

Analisis *dot blot* adalah suatu uji dimana *probe* ditambahkan ke DNA teramplifikasi yang telah difiksasi pada suatu substrat (membran). Jika produk amplifikasi tersebut mengandung DNA yang komplemen antar basanya dengan *probe*, maka akan terjadi reaksi kimia yang menghasilkan warna yang kuat (berdensitas warna tinggi). Dasar dari reaksi kolorimetrik ini adalah bahwa primer yang digunakan untuk mengamplifikasi telah dilabel dengan biotin pada ujung 5', karena itu setiap produk hasil amplifikasi mengandung label biotin. Setelah proses hibridisasi antara produk hasil amplifikasi dengan *probe* dan dilakukan pencucian untuk menghilangkan *probe* yang tidak berhibridisasi, selanjutnya ditambahkan reagen streptavidin-horse radish peroxidase (SA-HRP). Streptavidin mengikat kuat pada biotin, sebagai hasilnya HRP akan terikat pada produk amplifikasi. Enzim ini mengalami oksidasi dan mengkonversi reagen terlarut tak berwarna (tetramethyl benzidine) menjadi presipitat berwarna, dan *dot* yang mengandung *probe* yang cocok akan menjadi berwarna (Gambar 2.3). Suatu pemeriksaan pola

dot berwarna menunjukkan genotip dari sumber spesimen DNA (Kobilinsky dkk., 2005).



Gambar 2.3 Reaksi kolorimetrik antara biotin dan SA-HRP (Kobilinsky dkk., 2005)

2.7 Tinjauan Umum tentang Organ Target

2.7.1 Hepar

Hepar adalah organ yang berperan dalam hal detoksifikasi atau degradasi zat-zat dan hormon serta obat dan senyawa asing lainnya. Hepar tersusun menjadi unit-unit fungsional yang dikenal sebagai lobulus, yaitu susunan heksagonal jaringan yang mengelilingi sebuah vena sentral. Di tepi luar setiap ‘potongan’ lobulus terdapat tiga pembuluh, yaitu cabang arteri hepatica, cabang vena porta dan duktus biliaris. Darah dari cabang-cabang arteri hepatica dan vena porta tersebut mengalir dari perifer lobulus ke dalam ruang kapiler yang melebar yang disebut sinusoid. Sinusoid ini terdapat di antara barisan sel-sel hepar ke vena sentral. Vena sentral dari semua lobulus hepar menyatu untuk membentuk vena hepatica, yang menyalurkan darah keluar dari hepar. Venula-venula yang meninggalkan usus halus, bersama dengan pembuluh lain yang berasal dari sisa saluran pencernaan lainnya, mengalirkan isinya ke vena porta, yang mengangkut darah ke hepar. Oleh karena itu, apapun yang diserap ke dalam kapiler saluran pencernaan pertama-tama harus melewati pabrik biokimia hepar sebelum masuk ke sirkulasi umum. Bahan-bahan yang merugikan yang mungkin terserap akan didetoksifikasi

oleh hepar sebelum bahan-bahan tersebut memiliki akses ke sirkulasi umum. Setelah melewati sirkulasi porta, darah vena dari sistem pencernaan disalurkan ke vena kava dan dikembalikan ke jantung untuk didistribusikan ke seluruh tubuh, mengangkut glukosa dan asam amino untuk digunakan oleh jaringan (Sherwood, 2001).

2.7.2 Ginjal

Ginjal berperan dalam mengeliminasi konstituen-konstituen plasma yang tidak diperlukan ke dalam urin sementara menahan bahan-bahan yang bermanfaat bagi tubuh. Satuan fungsional pembentuk urin di ginjal adalah nefron, yang terdiri dari komponen vaskuler dan tubulus yang saling berkaitan. Komponen vaskuler terdiri dari dua jaringan kapiler yang terenkapsulasi, yang pertama adalah glomerulus, berkas kapiler yang menyaring sejumlah besar volume plasma-bebas protein ke dalam komponen tubulus. Jaringan kapiler kedua terdiri dari kapiler peritubulus, yang melingkari komponen tubulus. Kapiler peritubulus memberi makan jaringan ginjal dan ikut serta dalam pertukaran antara cairan tubulus dan plasma. Komponen tubulus berawal di kapsul Bowman, yang melingkupi glomerulus untuk menerima filtrat, dan kemudian berlanjut sebagai saluran berkelok-kelok yang berakhiri di pelvis ginjal. Sewaktu mengalir melalui berbagai bagian tubulus, filtrat mengalami modifikasi oleh sel-sel yang melapisi bagian dalam tubulus, tempat bahan-bahan yang diperlukan untuk mempertahankan komposisi dan volume cairan ekstrasel dikembalikan ke plasma. Zat yang tertinggal di tubulus kemudian diekskresikan sebagai urin. Ginjal melaksanakan tiga proses dasar dalam menjalankan fungsi regulatorik dan ekskretoriknya : a) filtrasi glomerulus, perpindahan non-diskriminatif plasma bebas-protein dari darah ke dalam tubulus; b) reabsorpsi tubulus, perpindahan selektif konstituen-konstituen tertentu dalam filtrat kembali ke darah kapiler peritubulus; dan c) sekresi tubulus, perpindahan yang sangat spesifik zat-zat tertentu dari darah kapiler peritubulus ke dalam cairan tubulus. Segala sesuatu yang difiltrasi dan diseckresikan tetapi tidak direabsorpsi akan diekskresikan sebagai urin (Sherwood, 2001).

2.7.3 Paru

Pernapasan internal mengacu kepada reaksi metabolisme intrasel yang menggunakan O_2 dan menghasilkan CO_2 selama oksidasi molekul-molekul nutrien penghasil energi. Pernapasan eksternal mencakup berbagai langkah yang terlibat dalam pemindahan O_2 dan CO_2 antara lingkungan eksternal dan sel jaringan. Sistem pernapasan dan sirkulasi berfungsi bersama-sama untuk melaksanakan pernapasan eksternal. Sistem pernapasan melaksanakan pertukaran udara antara atmosfer dan paru melalui proses ventilasi. Pertukaran O_2 dan CO_2 antara udara dalam paru dan darah dalam kapiler paru berlangsung melalui dinding kantung udara, atau alveolus yang sangat tipis. Saluran pernapasan mengantarkan udara dari atmosfer ke bagian paru tempat pertukaran gas tersebut berlangsung. Paru terletak di dalam kompartemen toraks yang tertutup, yang volumenya dapat diubah-ubah oleh aktivitas kontraktil otot-otot pernapasan (Sherwood, 2001).

BAB III

METODE PENELITIAN

3.1 Waktu dan Tempat

Penelitian ini dilaksanakan pada bulan Maret 2008-Oktober 2009 bertempat di Laboratorium Biologi Molekuler dan Seluler, Jurusan Biologi, Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam dan Laboratorium Sentral Ilmu Hayati Universitas Brawijaya, Malang.

3.2 Cara Kerja

3.2.1 Perlakuan hewan coba

Mencit BALB/c jantan usia 3 bulan dibagi ke dalam 3 kelompok perlakuan, yaitu: a) perlakuan formalin 0 mg/kg BB sebagai kontrol, b) perlakuan formalin 2 mg/kg BB, dan c) perlakuan formalin 5 mg/kg BB, dengan masing-masing kelompok perlakuan terdiri dari 10 ekor mencit. Mencit diaklimatisasi selama 7 hari. Mencit diberi pakan berupa pelet yang dipadatkan sebanyak 4 gram pada pagi hari, kemudian pada sore harinya sisa pakan yang diberikan diambil. Sebelum diberi pakan, mencit ditimbang berat badannya untuk menentukan volume larutan formalin yang dicekokkan, yang dihitung dengan rumus: Volume formalin yang dicekok (ml) = [volume cekok (g) / konsentrasi formalin yang digunakan (0,037 g)] x volume pelarut formalin (100 ml); dimana volume cekok = konsentrasi formalin yang ingin diberikan (mg/1000 g BB) x berat badan mencit (g). Pemberian minum dilakukan sepanjang hari. Perlakuan paparan formalin diberikan melalui jalur ingestif dengan cara disonde selama 3 bulan berturut-turut.

3.2.2 Isolasi DNA menggunakan *nucleospin tissue kit*

Mencit tanpa perlakuan dan mencit perlakuan didislokasi leher dan dibedah, diambil organ hepar, paru, dan ginjalnya lalu tiap organ dicuci dengan PBS sebanyak 3x dan ditimbang sebanyak 20 mg. 20 mg sampel lalu dihomogenasi menggunakan mortar dan *pestle* lalu ditambahkan 180 μ l *Buffer T1* dan dicampur sampai homogen. Homogenat lalu dimasukkan ke dalam tabung eppendorf steril dan ditambahkan 25 μ l larutan Proteinase-K, kemudian divortex sampai tercampur rata serta diinkubasi dalam *shaking incubator* pada suhu 56°C selama semalam. Keesokan harinya, tiap sampel divortex,

ditambahkan 200 μ l buffer B3, divortex kuat, lalu diinkubasi dalam *shaking incubator* pada suhu 70°C selama 10 menit. Sampel kemudian divortex sebentar, ditambahkan 210 μ l ethanol 96%, dan divortex kuat.

NuceloSpin Tissue column ditempatkan ke dalam *collecting tube*, kemudian sampel dimasukkan melalui *column*, disentrifugasi pada kecepatan 11.000 x g, suhu 4°C selama 1 menit. Cairan yang melewati *column* dibuang, *column* dipasang lagi ke *collecting tube*, dan ditambahkan 500 μ l *buffer BW*, lalu disentrifugasi pada kecepatan 11.000 x g, suhu 4°C selama 1 menit. Cairan yang melewati *column* dibuang, *column* dipasang lagi ke *collecting tube*, dan ditambahkan 600 μ l *buffer B5*, lalu disentrifugasi pada kecepatan 11.000 x g, suhu 4°C selama 1 menit. Cairan yang melewati *column* dibuang, *column* dipasang lagi ke *collecting tube*, kemudian *column* disentrifugasi kembali pada kecepatan 11.000 x g, suhu 4°C selama 1 menit. *NuceloSpin Tissue column* selanjutnya dimasukkan ke dalam tabung eppendorf 1,5 ml, ditambahkan 50 μ l *Elution buffer* hangat (70°C), diinkubasi pada suhu ruang selama 3 menit, dan disentrifugasi pada kecepatan 11.000 x g, suhu 4°C selama 1 menit, kemudian ditambahkan lagi dengan 50 μ l *Elution buffer* hangat (70°C), diinkubasi pada suhu ruang selama 3 menit, dan disentrifugasi pada kecepatan 11.000 x g, suhu 4°C selama 1 menit sehingga diperoleh hasil DNA yang terisolasi dalam cairan yang melewati *column*. Hasil isolasi DNA disimpan pada suhu -20°C jika tidak segera digunakan.

Elektroforesis gel agarosa 0,8%. Elektroforesis gel agarosa 0,8% dilakukan untuk memonitor keberhasilan isolasi DNA. *Plate*, *chamber*, dan *comb* dibersihkan dengan alkohol, lalu *plate* diatur kedatarannya dengan *waterpass*. Bubuk agarosa ditimbang sebanyak 0,24 gram, dimasukkan ke dalam Erlenmeyer, dan ditambah TBE 1x hingga volume larutan 30 ml. Erlenmeyer kemudian ditutup *plastic wrap*, *plastic wrap* ditusuk-tusuk dengan jarum pentul, Erlenmeyer dimasukkan ke dalam *microwave* dan dipanaskan selama 2 menit pada suhu medium. Larutan yang telah dipanaskan kemudian didinginkan hingga suhunya \pm 65°C, kemudian ditambah 0,2 \pm 5 μ l EtBr dan digoyang-goyang. Larutan agarosa lalu dituang ke *plate* yang telah dipasangi sisir, didiamkan selama 1 jam. Setelah gel agarosa mengeras, sisir dilepas, *plate* dipasang ke *chamber*, dan

digenangi dengan TBE 1x. Sampel DNA sebanyak 0,2 μ l dihomogenkan dengan 0,3 μ l *loading dye* di atas *micro titer plate* sampai merata, lalu diambil sebanyak 0,5 μ l, dimasukkan ke dalam sumuran, dan dielektroforesis pada 50 V selama 30-45 menit. Gel hasil elektroforesis kemudian divisualisasi dengan menggunakan *UV transluminator* dan didokumentasikan menggunakan kamera polaroid khusus.

Uji kuantitatif DNA (Spektrofotometri). Sampel DNA sebanyak 5 μ l dimasukkan ke dalam tabung eppendorf yang telah berisi 995 μ l TE buffer. Larutan TE buffer sebagai larutan blanko dimasukkan ke dalam kuvet, diukur nilai absorbansinya pada $\lambda = 260$ nm, dan dikalibrasi. Sampel DNA divortex, diambil sebanyak 200 μ l, dimasukkan ke dalam kuvet, dan diukur nilai absorbansinya pada $\lambda = 260$ nm. Perlakuan yang sama seperti di atas diulang untuk pengukuran nilai absorbansi pada $\lambda = 280$ nm. Hasil pengukuran nilai absorbansi dari kedua panjang gelombang kemudian dapat digunakan untuk menghitung kemurnian DNA ($\text{A}260/\text{A}280$) dan konsentrasi DNA ($[\text{DNA}] = \text{A}260 \times \text{faktor pengenceran} \times 50 \mu\text{g/ml}$).

3.2.3 Pembuatan *probe* STS 4 *Parp-1*

Polymerase Chain Reaction (PCR). *Free nuclease water Otsuka* dihomogenkan, diambil 36,4 μ l, dan dimasukkan ke dalam *thin wall*. PCR master mix 2x *Promega* diimpuls, divortex, *pipetting*, diambil 70 μ l, dimasukkan ke dalam *thin wall* yang telah berisi *free nuclease water*, *pipetting*. Primer STS 4 *Parp-1 forward* (5'-TTTTTAGCTAAAATAATGCTTAA-3') (10 pmole) dan Primer STS 4 *Parp-1 reverse* (5'-GTTGTTGTGGTT GTCCTA-3') (10 pmole) diimpuls, *mix gentle with finger*, masing-masing diambil sebanyak 2,8 μ l, dan dicampur ke dalam larutan sebelumnya. Urutan primer tersebut diperoleh dari NCBI (*The National Center for Biotechnology Information*). Larutan campuran hasil prosedur di atas dibagi ke dalam 12 *thin wall* masing-masing sebanyak 7,8 μ l, lalu tiap *thin wall* ditambahkan 2 μ l sampel DNA hasil isolasi dari hepar mencit tanpa perlakuan, di-spindown, dan dimasukkan ke dalam *thermal cycler* yang telah diprogram dengan program PCR sebagai berikut: a) *Hot start* pada suhu 94°C selama 1 menit; b) 30 siklus yang terdiri dari *Denaturation* pada suhu 94°C selama 30

detik, *Annealing* pada suhu 51°C selama 30 detik, *Extention* pada suhu 70°C selama 30 detik; dan c) *Post-extention* pada suhu 70°C selama 7 menit. Hasil PCR disimpan pada suhu -20°C jika tidak segera digunakan.

Elektroforesis gel agarosa 1,5%. Elektroforesis gel agarosa 1,5% dilakukan untuk memonitor keberhasilan PCR. *Plate*, *chamber*, dan *comb* dibersihkan dengan alkohol, lalu *plate* diatur kedatarannya dengan *waterpass*. Bubuk agarosa ditimbang sebanyak 0,45 g, dimasukkan ke dalam Erlenmeyer, dan ditambah TBE 1x hingga volume larutan 30 ml. Erlenmeyer kemudian ditutup *plastic wrap*, *plastic wrap* ditusuk-tusuk dengan jarum pentul, lalu erlenmeyer dimasukkan ke dalam *microwave* dan dipanaskan selama 2 menit pada suhu medium. Larutan yang telah dipanaskan kemudian didinginkan hingga suhunya $\pm 65^{\circ}\text{C}$, kemudian ditambah $0,2 \pm 5 \mu\text{l}$ EtBr dan digoyang-goyang. Larutan agarosa lalu dituang ke *plate* yang telah dipasangi sisir dan didiamkan sampai mengeras. Setelah gel agarosa mengeras, sisir dilepas, *plate* dipasang ke *chamber*, dan digenangi dengan TBE 1x.

Sampel DNA kemudian diambil sebanyak 3 μL dan dicampur dengan *loading dye* 1 μL diatas *micro titer plate* sampai merata, *pipetting*, dan dimasukkan ke dalam sumuran. DNA *marker* dan *loading dye marker* (1:2) juga dimasukkan ke dalam sumuran. Setelah semua sampel DNA dimasukkan di tiap titik awal sumuran, elektroda dihubungkan dengan *power supply* 50 volt selama 30-45 menit. Gel hasil elektroforesis kemudian divisualisasi dengan *UV transluminator* dan didokumentasikan menggunakan kamera polaroid khusus.

Elusi gel agarosa. Gel agarosa hasil elektroforesis diamati dan ditentukan posisi pita DNA dengan ukuran 245 bp. Pita DNA dengan ukuran 245 bp dipisahkan dari gel agarosa dengan cara dipotong menggunakan *scalpel* steril, ditentukan berat potongan gel, dan dimasukkan ke dalam tabung eppendorf steril. Setiap 100 mg gel agarosa ditambahkan dengan 200 μl *Buffer NT* lalu diinkubasi pada suhu 50°C selama 5-10 menit sampai potongan gel terlarut. Sampel divorteks kuat setiap 2-3 menit sampai potongan gel terlarut sempurna.

Sampel selanjutnya dimasukkan ke dalam *NucleoSpin Extract II Column* yang telah ditempatkan dalam *Collection Tube* (2 ml), disentrifugasi pada kecepatan 11.000 x g selama 1 menit. Cairan yang melewati *NucleoSpin Extract II Column* dibuang, *column* dipasang lagi ke *Collection Tube*, ditambahkan 600 μ l *Buffer NT3*, disentrifugasi pada kecepatan 11.000 x g selama 1 menit. Cairan yang melewati *NucleoSpin Extract II Column* dibuang, lalu *column* dipasang kembali ke *Collection Tube*, disentrifugasi pada kecepatan 11.000 x g selama 2 menit untuk menghilangkan sisa *Buffer NT3*. *NucleoSpin Extract II Column* selanjutnya ditempatkan dalam tabung eppendorf 1,5 ml steril, ditambahkan 15-50 μ l *Elution Buffer NE* dan diinkubasi pada suhu ruang selama 1 menit untuk meningkatkan hasil DNA yang dielusi, kemudian disentrifugasi pada kecepatan 11.000 x g selama 1 menit.

Pelabelan biotin nick translation menurut Roche. Pelabelan DNA *probe* yang telah dielusi dilakukan dengan cara 1 μ g DNA hasil elusi ditambahkan ke dalam ddH₂O steril hingga mencapai volume akhir 16 μ l, ditambahkan 4 μ l *Biotin-Nick Translation Mix*, pipetting, mix gentle with finger, disentrifugasi pada kecepatan 11.000 x g selama 1 menit, diinkubasi pada suhu 15°C selama 90 menit, dan di-stop reaksi dengan cara ditambahkan 1 μ l 0,5M EDTA (pH 8,0) dan dipanaskan pada suhu 65°C selama 10 menit.

Pengujian keberhasilan pelabelan biotin-nick translation. Dot blot untuk menguji keberhasilan pelabelan biotin dilakukan dengan cara DNA *probe* yang telah dilabel biotin (seri pengenceran 1 ng/ μ l, 100 pg/ μ l, 50 pg/ μ l, 1 pg/ μ l, 0,1 pg/ μ l, 0 pg/ μ l dilarutkan sampai volume 20 μ l dengan 6 μ l 20xSSC dan 18 μ l *destillated water*) didenaturasi selama 10 menit pada suhu 95°C dan dimasukkan ke dalam *ice bath* selama beberapa menit. 1 μ l DNA terlabel lalu diteteskan pada membran nilon yang telah dipasang pada *dot-blotter*, dihubungkan dengan *vacuum pump* selama 45 menit-1 jam, diinkubasi pada oven 100°C selama 30 menit, dan direhidrasi dengan *destillated water* suhu 37°C selama beberapa menit.

Membran nilon selanjutnya divisualisasi dengan cara meneteskan *Streptavidin-Horseradish Peroxidase* (SA-HRP) *Dakocytomacin* dalam 0,05M Tris-Cl dan 0,01M NaCl (1:1000) pada membran nilon

yang masih tetap terpasang dalam *dot-blotter* kemudian diinkubasi pada suhu ruang selama 1 jam. Setelah 1 jam, membran nilon lalu dicuci dengan PBS 2x5 menit, diteteskan *Amino Ethyl Carbazole* (AEC), diinkubasi pada suhu ruang selama 30 menit atau sampai terbentuk warna merah, dicuci kembali dalam PBS 2x5 menit, dicuci dengan *destillated water*, dan dikeringkan.

Setelah dilakukan uji keberhasilan pelabelan biotin-*nick translation*, selanjutnya dilakukan pula uji untuk mengetahui konsentrasi minimal dan terbaik dari DNA *probe* yang masih dapat digunakan untuk mendeteksi keberadaan DNA sampel yang komplemen, dengan menggunakan DNA *probe* terlebel biotin (seri pengenceran 1 ng/ μ l, 100 pg/ μ l, 50 pg/ μ l, 1 pg/ μ l, 0,1 pg/ μ l, 0 pg/ μ l) dan sampel DNA hepar perlakuan formalin 0 mg/kg BB (seri pengenceran 1 ng/ μ l, 100 pg/ μ l, 50 pg/ μ l, 1 pg/ μ l, 0,1 pg/ μ l, 0 pg/ μ l). Uji tersebut juga dilakukan dengan metode *dot blot* seperti uji keberhasilan pelabelan biotin-*nick translation*, kemudian dilakukan penilaian densitas warna hasil *dot blot* agar dapat ditentukan dari nilai densitas warna tersebut pada konsentrasi minimal berapakah dari DNA *probe* terlabel biotin dan sampel DNA yang dapat digunakan untuk melakukan deteksi mutasi gen *Parp-1*.

3.2.4 Deteksi mutasi gen *Parp-1* menggunakan *probe* STS 4 *Parp-1* terlabel biotin

Uji hibridisasi *probe* dilakukan dengan cara sampel DNA perlakuan (50 pg/ μ l) didenaturasi selama 10 menit pada suhu 95°C dan dimasukkan ke dalam *ice bath* selama beberapa menit, selanjutnya diaplikasikan sebanyak 1 μ l pada membran nilon yang telah dipasang pada *dot-blotter*, dihubungkan dengan *vacuum pump* selama 45 menit-1 jam, diinkubasi pada oven 100°C selama 30 menit, dan direhidrasi dengan *destillated water* suhu 37°C selama beberapa menit.

Membran nilon tetap berada di dalam *dot-blotter*, diteteskan 50 μ l 2x SSC (dikondisikan 65°C), dan diinkubasi pada suhu 65°C selama 1 jam dalam *shaking incubator* (60 rpm). Setelah 1 jam, larutan prehibridisasi dibuang, ditambahkan larutan hibridisasi (DNA *probe* terlabel Biotin dalam 2xSSC dengan perbandingan 1:1500, untuk membran nilon diambil 1500 μ l 2xSSC dimasukkan tabung eppendorf, ditambahkan 1 μ l DNA *probe* terlabel Biotin, *pipetting*),

diinkubasi pada suhu 65°C selama 15 menit, lalu diinkubasi dalam *waterbath* suhu 60°C selama 20 jam. Setelah inkubasi selama 20 jam, membran nilon lalu dicuci dengan 2xSSC, SDS 0,1%, pada suhu 65°C selama 15 menit. Pencucian diulang sebanyak 2x.

Visualisasi membran nilon dilakukan dengan cara meneteskan SA-HRP dalam 0,05M Tris-Cl dan 0,01M NaCl (1:1000) pada membran nilon yang masih tetap terpasang dalam *dot-blotter* dan diinkubasi pada suhu ruang selama 1 jam. Setelah 1 jam, membran nilon lalu dicuci dengan PBS 2x5 menit, diteteskan AEC, diinkubasi pada suhu ruang selama 30 menit atau sampai terbentuk warna merah, dicuci kembali dalam PBS 2x5 menit, dicuci dengan *destillated water*, dan dikeringkan.

3.2.5 Pengamatan

Pengamatan dilakukan dengan cara menilai densitas warna merah yang terbentuk dari hasil *dot blot* dengan menggunakan *Chemidoc Gel/Membran Analyzer*.

3.2.6 Analisis data

Data yang diperoleh dianalisis secara deskriptif dengan cara menghitung frekuensi kejadian mutasi yang terjadi dengan rumus berikut (Brooker, 1999) :

$$\text{Frekuensi kejadian mutasi (\%)} = \frac{\text{(jumlah kejadian mutasi / total jumlah kejadian)}}{} \times 100 \%$$

Frekuensi kejadian mutasi dari tiap perlakuan akan menghasilkan nilai dengan kisaran 0-100 %, dimana nilai 0 menunjukkan sampel normal, sedangkan nilai 100% menunjukkan sampel mutasi, sehingga jika nilai frekuensi kejadian mutasi semakin mendekati 100% maka kecenderungan sampel mengalami mutasi semakin besar.

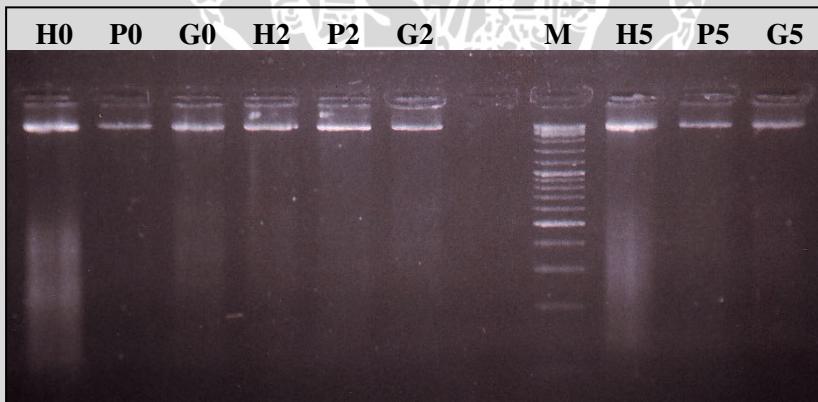
BAB IV

HASIL DAN PEMBAHASAN

4.1 Hasil

4.1.1 Isolasi DNA

Isolasi DNA menggunakan *NucleoSpin Tissue Kit* memiliki prinsip dasar sebagai berikut, pelisisan sel dicapai dengan cara menginkubasi material sampel dalam larutan Proteinase-K, selanjutnya DNA diikat ke membran silica dalam *NucleoSpin Tissue Column* di bawah kondisi yang cocok yang dihasilkan melalui penambahan garam *chaotropic* dan ethanol ke *lysate*. Proses pengikatan tersebut bersifat spesifik terhadap asam nukleat. Kontaminan dihilangkan melalui pencucian bertahap dengan menggunakan dua *buffer* yang berbeda. DNA genomik murni yang didapatkan kemudian dielusi dalam buffer elusi yang sedikit alkali dan berkekuatan ionik rendah. Isolasi DNA yang dilakukan menghasilkan pita-pita DNA berkualitas baik (hanya terdapat sedikit *smear*) yang menunjukkan bahwa DNA telah berhasil diisolasi dan tidak mengandung banyak kontaminan (Gambar 4.1).

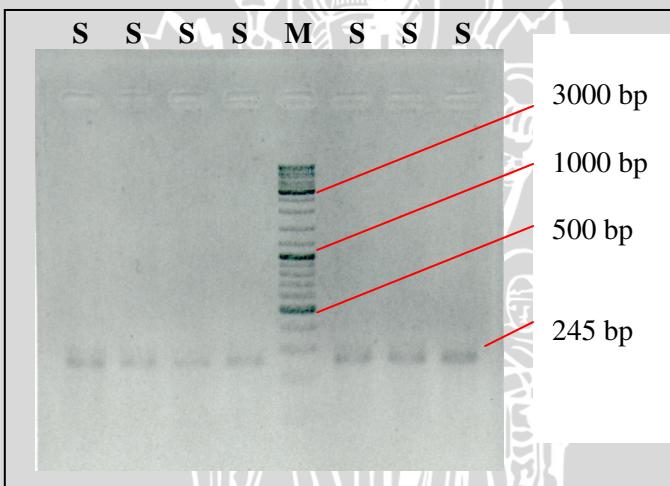


Gambar 4.1 Hasil isolasi DNA total menggunakan elektroforesis gel agarosa 0,8%. Keterangan : M = DNA marker; H = DNA hepar; P = DNA paru; G = DNA ginjal; 0 = sampel perlakuan formalin 0 mg/kg BB; 2 = sampel perlakuan formalin 2 mg/kg BB; 5 = sampel perlakuan formalin 5 mg/kg BB

4.1.2 Pembuatan *probe* STS 4 *Parp-1*

a. *Polymerase Chain Reaction (PCR)* dan elusi

Pembuatan *probe* STS 4 *Parp-1* diawali dengan proses PCR menggunakan sampel DNA hepar mencit tanpa perlakuan serta primer STS 4 *Parp-1 forward* (5'-TTTTAGCTAAAATAATGC TTAA-3') dan primer STS 4 *Parp-1 reverse* (5'-GTTGTTGTGGT TTGTCCTA-3') yang diperoleh dari NCBI (*The National Center for Biotechnology Information*). Proses PCR yang dilakukan menghasilkan fragmen DNA 245 bp (Gambar 4.2). Hal ini telah sesuai dengan yang tertera dalam NCBI yang menyebutkan bahwa ukuran produk PCR menggunakan primer STS 4 *Parp-1* akan menghasilkan fragmen DNA 245 bp, sehingga gel agarosa yang mengandung fragmen DNA 245 bp tersebut dapat dielusi.



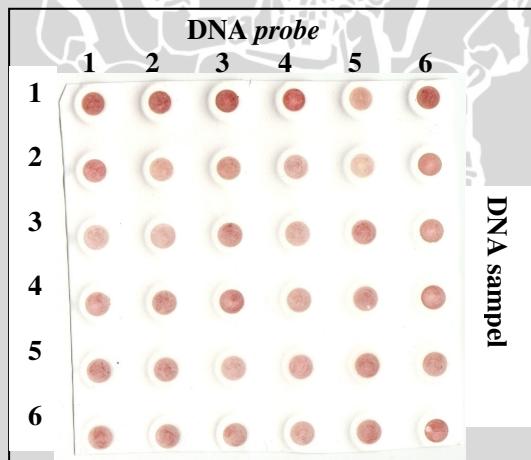
Gambar 4.2 Hasil PCR menggunakan gel agarosa 1,5 % menghasilkan fragmen DNA 245 bp. Keterangan : S = DNA hasil PCR; M = DNA marker

Pita DNA hasil PCR dengan panjang fragmen 245 bp selanjutnya dielusi menggunakan *NucleoSpin Extract II Kit* dengan prinsip dasar bahwa DNA terikat pada membran silika jika terdapat garam *chaotropic* yang terkandung dalam *binding buffer*. *Chaotropic agent* akan mendenaturasi protein, melarutkan agarosa dan meningkatkan

pengikatan DNA untai ganda pada suatu matriks. Kontaminan seperti garam dan komponen makromolekuler terlarut dihilangkan melalui tahap pencucian sederhana dengan *ethanolic wash buffer*. Setelah DNA terikat pada matriks, protein dan garam akan mudah dihilangkan dari DNA, sehingga DNA murni dapat dielusi dalam *buffer* yang sedikit alkali di bawah kondisi kekuatan ionik rendah.

b. Pelabelan biotin-*nick translation*

Fragmen DNA 245 bp kemudian dilabel dengan biotin. Prinsip pelabelan biotin menurut Roche adalah metode *nick translation* yang berdasar pada kemampuan Dnase I untuk memperkenalkan *randomly distributed nicks* ke dalam DNA pada konsentrasi enzim rendah dalam keberadaan MgCl₂. *E coli* DNA Polymerase I menyintesis komplemen DNA (*DNA complementary*) menjadi untai utuh dengan arah 5' → 3' menggunakan 3'-OH termini dari *nick* sebagai primer. DNA polymerase I juga bersifat eksonukleolitik sehingga secara simultan mengambil nukleotida searah dengan sintesis. Selanjutnya, polymerase mengganti nukleotida yang diambil dengan dNTP yang berlabel isotop atau berlabel hapten. Pada suhu rendah (15°C), DNA yang tidak terlabel digantikan oleh DNA terlabel yang baru disintesis.



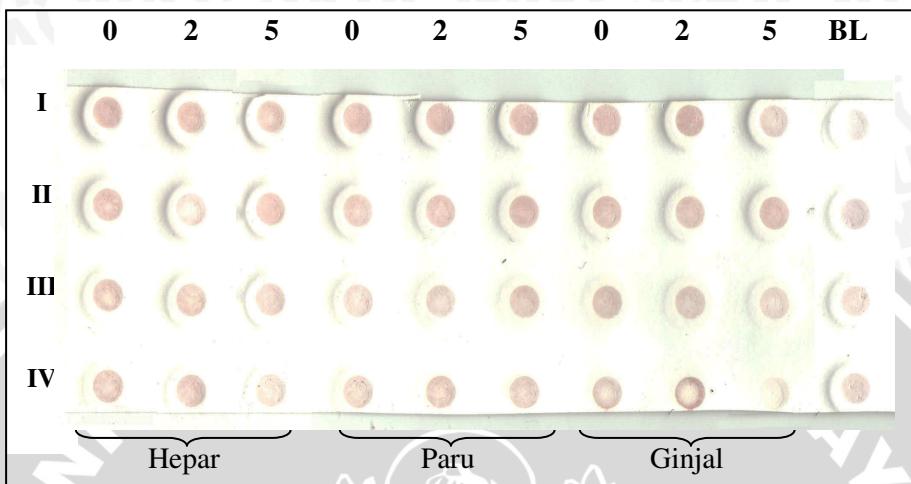
Gambar 4.3 Hasil uji *dot blot* untuk mengetahui konsentrasi minimal dan terbaik antara DNA *probe* dan sampel. Keterangan : 1 = 1 ng/μl; 2 = 100 pg/ μl; 3 = 50 pg/μl; 4 = 1 pg/μl; 5 = 0,1 pg/μl; 6 = 0 pg/μl

Uji pelabelan yang dilakukan menghasilkan *dot* berwarna merah dengan intensitas warna yang semakin rendah seiring dengan menurunnya konsentrasi DNA *probe* terlabel biotin yang diujikan, sehingga dapat disimpulkan bahwa DNA *probe* telah berhasil dilabel oleh biotin. Pada uji *dot blot* untuk mengetahui konsentrasi minimal dan terbaik dari DNA *probe* terlabel biotin yang masih dapat digunakan untuk mendeteksi keberadaan DNA sampel yang komplemen, setelah dinilai densitas warnanya, dapat diketahui bahwa DNA *probe* konsentrasi 1 pg/ μ l dan DNA sampel konsentrasi 50 pg/ μ l menghasilkan nilai densitas warna yang stabil sehingga hasil tersebut dijadikan dasar untuk melakukan uji *dot blot* untuk mendeteksi mutasi gen *Parp-1* (Gambar 4.3).

c. Deteksi mutasi menggunakan *probe* STS 4 *Parp-1*

Deteksi mutasi gen *Parp-1* dilakukan dengan metode *dot blot* menggunakan *probe* STS 4 *Parp-1*. Saat proses hibridisasi, bila *probe* mengenali sekuens DNA sampel yang diuji maka akan terjadi proses pemasangan basa antara kedua untai tunggal DNA yang komplementer sehingga menghasilkan sinyal (*dot*) berwarna merah sebagai produk dari reaksi antara enzim SA-HRP (*Streptavidin-Horseradish Peroxidase*) dengan substrat AEC (*Amino Ethyl Carbazole*), pada keadaan ini maka dapat dinyatakan bahwa DNA sampel yang diuji normal. Bila *probe* tidak mengenali sekuens DNA sampel yang diuji maka tidak terjadi proses hibridisasi sehingga densitas warna merah pada *dot* menjadi rendah karena terdapat daerah pada sekuens DNA yang diuji yang tidak dapat dikenali oleh sekuens DNA *probe*, pada keadaan seperti ini maka dapat dinyatakan bahwa DNA sampel yang diuji mengalami mutasi.

Uji *dot blot* yang dilakukan menghasilkan *dot* berwarna merah (Gambar 4.4) yang menunjukkan bahwa *probe* STS 4 *Parp-1* mengenali sekuens DNA sampel. Intensitas warna merah yang berbeda-beda pada tiap *dot* menunjukkan perbedaan jumlah sekuens DNA sampel yang berhasil dikenali oleh *probe*. Intensitas warna merah yang semakin tinggi menunjukkan semakin banyak sekuens DNA yang berhasil dikenali *probe*, begitu juga sebaliknya. Adanya sekuens DNA sampel yang tidak dikenali *probe* disebabkan adanya basa nitrogen pada sekuens DNA sampel yang tidak komplemen dengan basa nitrogen pada *probe* sehingga *probe* tidak dapat berhibridisasi dengan DNA sampel.



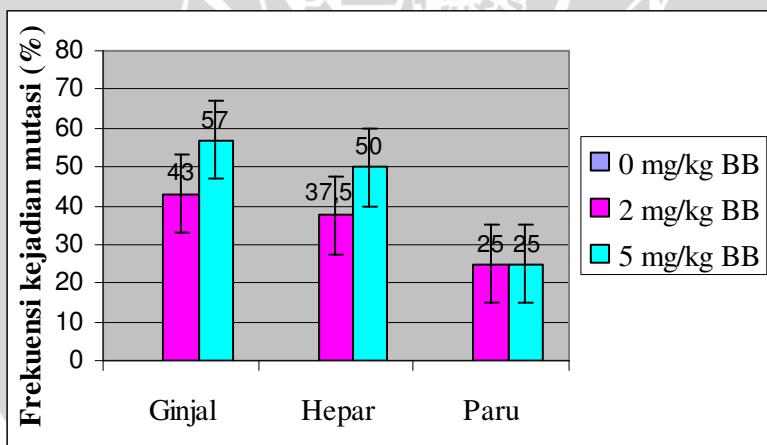
Gambar 4.4 Hasil uji *dot blot* untuk mendeteksi mutasi gen *Parp-1*. Keterangan : 0 = sampel perlakuan 0 mg/kg BB; 2 = sampel perlakuan 2 mg/kg BB; 5 = sampel perlakuan 5 mg/kg BB; BL = blanko; I, II, III, IV = ulangan

Hasil uji *dot blot* selanjutnya dianalisis menggunakan *Chemidoc Gel/Membran Analyzer* untuk mengetahui nilai densitas warnanya. Nilai densitas warna yang diperoleh (Lampiran 3) digunakan untuk menentukan apakah suatu sampel mengalami mutasi ataukah tidak dengan menggunakan nilai densitas warna *dot* perlakuan formalin 0 mg/kg BB sebagai standar acuan penilaian (Lampiran 4). Jika nilai densitas warna suatu sampel lebih dari nilai standar maka sampel tersebut diasumsikan mengalami mutasi, sedangkan jika nilai densitas warna suatu sampel kurang dari nilai standar maka sampel tersebut diasumsikan tidak mengalami mutasi. Jika nilai densitas warna suatu sampel melebihi nilai densitas warna blanko, maka sampel tersebut tidak dihitung sebagai mutasi/tidak mutasi karena memiliki nilai densitas warna yang lebih putih daripada nilai densitas warna blanko. Hasil penilaian setiap sampel (mutasi/tidak mutasi) selanjutnya digunakan untuk menghitung frekuensi kejadian mutasi.

Tabel 4.1 Penilaian sampel mutasi

Ulangan	Hepar			Paru			Ginjal		
	0	2	5	0	2	5	0	2	5
I	TM	TM	TM	TM	TM	TM	TM	TM	M
II	TM	TM	M	TM	TM	TM	TM	TM	TM
III	TM	TM	TM	TM	M	TM	TM	M	M
IV	TM	M	TM	TM	TM	M	TM	TM	-
V	TM	M	M	TM	TM	TM	TM	M	TM
VI	TM	M	M	TM	TM	TM	TM	M	M
VII	TM	TM	M	TM	M	TM	TM	-	M
VIII	TM	TM	TM	TM	TM	M	TM	TM	TM
Frek. kejadian mutasi	0/8 x 100% = 0%	3/8 x 100% = 37 ,5%	4/8 x 100% = 50%	0/8 x 100% = 0%	2/8 x 100% = 25%	2/8 x 100% = 25%	0/8 x 100% = 0%	3/7 x 100% = 43%	4/7 x 100% = 57%

Keterangan : 0 = sampel perlakuan 0 mg/kg BB; 2 = sampel perlakuan 2 mg/kg BB; 5 = sampel perlakuan 5 mg/kg BB; M = mutasi; TM = tidak mutasi; - = tidak dinilai (karena nilai densitas warnanya melebihi nilai densitas warna untuk blanko)



Gambar 4.5 Grafik frekuensi kejadian mutasi gen *Parp-1* pada organ ginjal, hepar, dan paru setelah paparan formalin

Pengaruh paparan formalin terhadap gen *Parp-1* pada mencit BALB/c dapat diketahui melalui frekuensi kejadian mutasi dari tiap perlakuan pada masing-masing organ target, yaitu hepar, paru dan ginjal (Gambar 4.5). Gambar 4.5 menunjukkan bahwa formalin berpotensi menyebabkan mutasi gen *Parp-1*, dengan urutan kerentanan organ mengalami mutasi gen *Parp-1* akibat paparan formalin adalah ginjal, hepar dan paru. Peningkatan konsentrasi formalin yang diberikan (2 mg/kg BB menjadi 5 mg/kg BB) cenderung meningkatkan frekuensi kejadian mutasi gen *Parp-1*. Hasil tersebut dibuktikan dengan meningkatnya frekuensi kejadian mutasi gen *Parp-1* yang terjadi pada organ ginjal (43% pada perlakuan formalin 2 mg/kg BB dan 57% pada perlakuan formalin 5 mg/kg BB) dan organ hepar (37,5% pada perlakuan formalin 2 mg/kg BB dan 50% pada perlakuan formalin 5 mg/kg BB), namun peningkatan tersebut tidak terjadi di paru.

4.2 Pembahasan

Formalin memiliki berat molekul sangat rendah, yaitu 30,03 g/mol, sehingga formalin dapat dengan mudah melintasi membran sel tanpa harus melalui mekanisme tertentu dan menyebarkan efek toksiknya ke setiap sel yang dilewatinya. Paparan formaldehida melalui jalur oral segera diserap ke dalam sel mukosa gastrointestinal (Anonymous³, 1995). Namun, sulit untuk membedakan fraksi formaldehida yang akhirnya diserap melewati saluran gastrointestinal (Anonymous², 1999). Paparan formaldehida telah dibuktikan mampu menyebabkan peningkatan konsentrasi asam format dalam darah (dalam waktu menit per observasi) (Eells dkk., 1981). Hal tersebut dapat dikarenakan formaldehida yang diserap akan dimetabolisasi menjadi format dalam saluran gastrointestinal (yang kemudian akan diserap dengan cepat) atau formaldehida diserap dan dimetabolisasi dengan cepat menjadi asam format dalam darah (Galli dkk., 1983; Burkhardt dkk., 1990). Tetapi, penelitian yang telah dilakukan belum dapat membedakan apakah kinetika absorpsi oral formaldehida terpisah dengan kinetika metabolisme formaldehida menjadi asam format.

Buss dkk. (1964) menyatakan bahwa 40% dari formaldehida terlabel radioaktif yang diberikan secara oral kepada rodentia (7 mg/kg BB) akan dieliminasi sebagai karbondioksida dalam waktu 12 jam, sementara 10% lainnya dieliminasi melalui urin dan 1% lainnya

dalam feses. Untuk mengetahui jumlah gugus methyl yang berikatan dengan makromolekul dapat diketahui dengan cara menghitung jumlah karbon terlabel radioaktif yang masih ada. Formaldehida tidak diharapkan untuk masuk ke dalam aliran darah dan dibawa sebagai suatu molekul tidak termetabolisasi ke sistem organ lainnya. Karena itu, distribusi dan ekskresi tidak dikatakan menjadi pertimbangan signifikan dengan paparan dan toksisitas formaldehida. Sebagai gantinya, cepatnya metabolisme dan reaktivitas formaldehida menunjukkan bahwa formaldehida akan dimetabolisasi atau akan menggunakan efek toksiknya pada titik paparan. Toksisitas formaldehida dibuktikan saat besarnya paparan cukup dimana mekanisme detoksifikasi formaldehida bersifat jenuh dan molekul formaldehida reaktif dimungkinkan untuk menggunakan efeknya pada jaringan non-lokal dan makromolekul (sebagai contoh protein dan DNA) (Heck and Cassanova, 1990).

Probe STS 4 *Parp-1* dapat digunakan untuk mendeteksi mutasi gen *Parp-1* pada mencit BALB/c yang dipapar formalin, hal tersebut dapat diketahui dari nilai frekuensi kejadian mutasi gen *Parp-1*. Frekuensi kejadian mutasi gen *Parp-1* yang lebih tinggi pada ginjal (43% pada perlakuan formalin 2 mg/kg BB dan 57% pada perlakuan formalin 5 mg/kg BB) daripada hepar (37,5% pada perlakuan formalin 2 mg/kg BB dan 50% pada perlakuan formalin 5 mg/kg BB) dapat dikarenakan mekanisme detoksifikasi formalin telah bersifat jenuh sehingga formalin dapat bersifat reaktif pada jaringan non-lokal dan makromolekul. Kejenuhan mekanisme detoksifikasi formalin dapat disebabkan formalin tidak dapat dikonjugasi seluruhnya oleh glutathion di hepar. Menurut Gulec dkk (2006), formalin dalam tubuh dapat menurunkan kadar glutathion. Padahal glutathion merupakan mekanisme pertahanan yang penting terhadap senyawa toksik. Penurunan kadar glutathion dalam hepar akibat paparan formalin sub-kronis menyebabkan formalin yang masuk tidak dapat dikonjugasi seluruhnya oleh glutathion sehingga formalin terakumulasi dalam darah dan ikut beredar bersama aliran darah dari hepar menuju jantung dan selanjutnya diteruskan menuju ginjal untuk melewati proses filtrasi. Glutathion pada ginjal yang berada dalam jumlah jauh lebih sedikit daripada di hepar kemudian tidak mampu mengkonjugasi semua senyawa formalin yang memaparnya karena paparan formalin terdapat dalam jumlah jauh lebih besar. Akibatnya, akumulasi formalin di ginjal lebih tinggi dan hal ini

meningkatkan peluang bagi formalin untuk berikatan dengan DNA secara bebas, merubah struktur DNA dan memicu terjadinya mutasi dengan tingkat kejadian yang lebih tinggi dibandingkan di hepar. Sedangkan pada paru yang memiliki frekuensi kejadian mutasi gen *Parp-1* terendah (25% pada perlakuan formalin 2 mg/kg BB dan 5 mg/kg BB), hal ini dapat disebabkan perlakuan formalin yang diberikan tidak melalui jalur inhalasi sehingga formalin tidak memapar paru secara langsung, seperti yang disebutkan oleh Gad (2007) bahwa inhalasi xenobiotik dapat menyebabkan paparan langsung pada paru yang dapat menjadi toksin potensial dalam jumlah besar.

Pada reaksi konjugasi dengan glutathion, sejumlah xenobiotik elektrofilik yang potensial beracun (seperti karsinogen tertentu) akan terkonjugasi ke glutathion nukleofilik dalam reaksi yang dapat digambarkan sebagai berikut:



R adalah xenobiotik elektrofilik. Enzim yang mengkatalisis reaksi ini disebut glutathion S-transferase dan terdapat dalam sitosol sel hepar dengan jumlah yang tinggi dan dalam jaringan lainnya dengan jumlah yang lebih rendah. Jika xenobiotik yang potensial beracun itu tidak terkonjugasi, molekulnya akan bebas membentuk ikatan kovalen dengan DNA, RNA atau protein sel dan dengan demikian dapat mengakibatkan kerusakan sel yang serius. Sebagian besar perhatian ditujukan pada produk yang terbentuk dengan DNA. Karsinogen ternyata berinteraksi dengan purin, pirimidin, atau gugus fosfodiester DNA. Tapak penyerangan yang paling lazim adalah guanin, dan adisi berbagai karsinogen kepada atom N₂, N₃, N₇, O₆ serta O₈ basa ini sudah diamati. Karena itu, glutathion merupakan mekanisme pertahanan yang penting terhadap senyawa toksik tertentu seperti beberapa obat dan karsinogen. Jika kadar glutathion dalam suatu jaringan seperti hepar menurun (seperti pada pemberian senyawa tertentu yang bereaksi dengan glutathion kepada tikus), maka jaringan tersebut bisa menjadi lebih rentan terhadap cedera oleh zat kimia yang dalam keadaan normal akan terkonjugasi ke glutathion. Konjugat glutathion selanjutnya mengalami metabolisme lagi sebelum diekskresikan ke dalam urine (Murray dkk., 2000).

Pada mamalia, formaldehida akan mengalami metabolisme, dimana formaldehida dikonversi menjadi format atau asam format dan akhirnya diubah menjadi karbondioksida dan air. Konversi formaldehida menjadi asam format dikatalisis oleh *formaldehyde dehydrogenase* (FDH)/*alcohol dehydrogenase 3 complex* (dengan glutathione (GSH) dan *nicotinamide adenine dinucleotide* (NAD⁺) berperan sebagai kofaktor), karena afinitas spesifiknya untuk formaldehida, meskipun sistem enzim lainnya memiliki kemampuan untuk mengoksidasi aldehida (Teng dkk., 2001). FDH (atau juga didefinisikan sebagai *alcohol dehydrogenase* (ADH3) terdapat di hampir semua jaringan tetapi umumnya lebih banyak terdapat di hepar dan eritrosit dan berperan sangat efisien dalam menghadapi formaldehida endogen atau eksogen. Metabolisme asam format menjadi karbondioksida dan air jauh lebih lambat daripada metabolisme formaldehida yang bergantung pada FDH/ADH3 (55 menit waktu paruh plasma dibanding 1 menit) (Stratemann dkk., 1968). Tahapan metabolik ini bergantung pada aksi enzimatik *tetrahydrofolate* (Pandey dkk., 2000). Alteratif lainnya adalah asam format akan diekskresikan sebagai garam dalam urin atau dapat memasuki *one-carbon metabolic pool* (Restani and Galli, 1991) dimana asam format tersebut bergabung sebagai suatu gugus methyl ke dalam asam nukleat atau protein (Thrasher and Kilburn, 2001).

Formalin yang masuk ke dalam tubuh melalui jalur ingestii, saat diserap dari usus, selanjutnya didistribusikan pertama kali ke hepar dan segera didetoksifikasi. Hepar bersifat rentan terhadap formalin disebabkan sejumlah besar aliran darah yang mensuplaiinya dan peranannya dalam metabolisme, karena itu hepar dapat terekspos formalin dalam dosis tinggi. Sedangkan ginjal adalah organ ekskretori utama, diikuti oleh saluran gastrointestinal dan paru. Sejumlah besar serum darah difiltrasi melalui ginjal. Bahan toksik yang larut lemak akan direabsorpsi dan terkonsentrasi dalam sel ginjal. Fungsi ginjal yang rusak menyebabkan eliminasi bahan toksik menjadi lebih lambat dan meningkatkan potensi toksik. Toksisitas pada ginjal dapat menyebabkan toksisitas sistemik yang menyebabkan menurunnya kemampuan untuk mengekskresikan sisa metabolisme tubuh (Kane, 2004).

Jika metabolisme formaldehida menjadi format terhambat atau mekanisme metabolismik tersebut berlebihan, maka jumlah formaldehida dalam tubuh akan meningkat hingga mencapai suatu

titik dimana formaldehida mampu membentuk ikatan antar protein atau antara protein dan DNA (Anonymous², 1999). Perbaikan yang tidak sempurna akibat ikatan antara DNA dengan protein dapat memicu pembentukan mutasi, khususnya mutasi kromosom dan *micronuclei* pada sel yang berproliferasi (Speit and Schmid, 2006). Efek jangka panjang dari mutasi *irreversible* berkontribusi terhadap onkogenesis (Hoeijmakers, 2001). Pada mamalia, ketidakmampuan untuk memperbaiki kerusakan DNA memicu berbagai gangguan penyakit dan memperbesar tingkat perkembangan tumor (Zhou and Elledge, 2000). Defisiensi *base excision repair* (BER) pada manusia tidak diwariskan kepada keturunannya, tetapi inaktivasi protein utama dalam BER menginduksi letalitas embrionik. Kerusakan DNA menimbulkan akibat yang beragam dan biasanya merugikan. Efek akut timbul dari metabolisme DNA yang terganggu, memicu penghentian/penghambatan siklus sel atau kematian sel (Hoeijmakers, 2001).

Penilaian sampel mutasi dengan cara menghitung frekuensi kejadian mutasi karena mutasi bersifat acak, sehingga tidak semua organ yang terpapar xenobiotik yang sama mengalami frekuensi kejadian mutasi yang sama. Menurut Anonymous⁷ (2009), mutasi gen adalah perubahan permanen pada urutan DNA yang menyusun gen. Mutasi gen mencegah satu atau lebih protein bekerja dengan tepat. Dengan merubah instruksi gen untuk membuat suatu protein, suatu mutasi dapat menyebabkan protein mengalami malfungsi atau bahkan tidak berfungsi sama sekali. Saat mutasi mengubah protein yang berperan penting dalam tubuh, hal tersebut dapat mengganggu perkembangan normal atau menyebabkan kondisi medis.

BAB V

KESIMPULAN DAN SARAN

5.1 Kesimpulan

Formalin berpotensi menyebabkan mutasi gen *Parp-1*. Frekuensi kejadian mutasi pada ginjal, hepar dan paru akibat paparan formalin 2 mg/kg BB serta 5 mg/kg BB berturut-turut sebesar 43%, 37,5 % dan 25% serta 57%, 50% dan 25%, sehingga dapat disimpulkan bahwa ginjal paling rentan terhadap paparan formalin 2 mg/kg BB dan 5 mg/kg BB. Peningkatan dosis formalin menjadi 5 mg/kg BB juga turut meningkatkan kejadian mutasi gen *Parp-1* pada ginjal dan hepar, namun tidak terjadi pada paru.

5.2 Saran

Perlu dilakukan penelitian lebih lanjut apakah mutasi gen *Parp-1* mempengaruhi ekspresi protein PARP-1 dengan menggunakan metode *western blotting* dan immunohistokimia.

DAFTAR PUSTAKA

- Anonymous¹. 2008. Formaldehyde. <http://www.geocities.com>. Tanggal akses 29 April 2008
- Anonymous². 1999. Toxicological Profile for Formaldehyde. <http://www.atsdr.cdc.gov>. Tanggal akses 29 April 2008
- Anonymous³. 1995. Formaldehyde. *IARC* Vol.: 62, 217
- Anonymous⁴. 2003. Formaldehyde. Health-based recommended occupational exposure limit. *ISBN* 90-5549-469-0
- Anonymous⁵. 1999. Formaldehyde. <http://www.inchem.org>. Tanggal akses 29 April 2008
- Anonymous⁶. 2005. Sequence Tagged Site. <http://www.iscid.org/>. Tanggal akses 20 Januari 2009
- Anonymous⁷. 2009. What is A Gene Mutation and How Do Mutations Occur? <http://ghr.nlm.nih.gov>. Tanggal akses 16 Oktober 2009
- Akey, J. M., Sosnoski, D., Parra, E., Dios, S., Hiester, K., Su, B., Bonilla, C., Jin, L., and Shriver, M. D. 2001. Melting Curve Analysis of SNPs (McSNP): A Gel-free and Inexpensive Approach for SNP Genotyping. *Biotechniques*. 2001 Feb;30(2):358-62, 364, 366-7
- Boulikas, T. 1991. Relation between Carcinogenesis, Chromatin Structure and Poly(ADP-ribosylation). *Anticancer Res* 11: 489-528
- Brooker, R. J. 1999. *Genetic Analysis and Principles*. Addison weasley Longman, Inc. California
- Burkhart, K.K., K.W. Kulig, and K.E. McMartin. 1990. Formate levels following formalin ingestion. *Vet. Hum. Toxicol.* 32(2):135-137

- Buss, J., K. Kuschinsky, H. Kewitz, and W. Koransky. 1964. Enteric resorption of formaldehyde. *Naunyn-Schmiedebergs Arch. Exp. Pathol. Pharmakol.* 247:380-381
- Clark, D. P. 2005. *Molecular Biology, Understanding The Genetic Revolution*. Elsevier, Inc. United Kingdom
- D'Amours, D., S. Desnoyers, I. D'Silva, and G. G. Poirier. 1999. Poly(ADP-ribosyl)ation reactions in the regulation of nuclear functions. *Biochem J* 342: 249-268
- Dantzer, F., Nasheuer, H.P., Vonesch, J.L., de Murcia, G., and Menissier-de Murcia, J. 1998. Functional Association of Poly(ADP-ribose) Polymerase with DNA Polymerase Alpha-primase Complex: A Link between DNA Strand Break Detection and DNA Replication. *Nucleic Acids Res.* 26: 1891-1898
- de Murcia, G. and Shall, S. 2000. *From DNA Damage and Stress Signalling to Cell Death: poly (ADP-Ribosylation) reactions*. Oxford University Press, New York, NY.
- de Murcia, G. and Menessier-de Murcia, J. 1994. Poly(ADP-ribose) polymerase: A molecular nick-sensor. *Trends in Biochemical Sciences* 19: 172-176 (1994)
- Eells, J.T., K.E. McMartin, K. Black, V. Virayotha, R.H. Tisdell, and T.R. Tephly. 1981. Formaldehyde poisoning: Rapid metabolism to formic acid. *JAMA* 246:1237-1238
- Gad, S. C. 2007. *Animal Models in Toxicology*, Second Edition. CRC Press. Boca Raton
- Galli, C.L., C. Ragusa, and P. Resmini. 1983. Toxicological evaluation in rats and mice of the ingestion of a cheese made from milk with added formaldehyde. *Food Chem. Toxicol.* 21:313-317

- Gong, J. and S. J. Sturla. 2007. Chemical Probe Seeks Out DNA Damage. *J. Am. Chem. Soc.* 2007, DOI: 10.1021/ja070688g
- Grafstrom, R. C., A. J. Fornace Jr, H. Autrup, J. F. Lechner, and CC Harris. 1983. Formaldehyde Damage to DNA and Inhibition of DNA Repair in Human Bronchial Cells. *Science*, Vol 220, Issue 4593, 216-218
- Gregory-Evans, C.Y., Moosajee, M., Hodges, M. D., Mackay, D. S., Game, L., Vargesson, N., Bloch-Zupan, A., Ruschendorf, F., Santos-Pinto, L., and Wackens, G. 2007. SNP Genome Scanning Localises Oto-Dental Syndrome to Chromosome 11q13 and Microdeletions at This Locus Implicate FGF3 in Dental and Inner Ear Disease and FADD in Ocular Coloboma. *Human Molecular Genetics*. 16:2482-2493
- Gulec, M., Gurel A., and Amerte F. 2006. Vitamin E Protect Against Oxidative Damage Caused by Formaldehyde in the Liver and Plasma of Rat. <http://www.springlink.com/content/q/pages.p.1-3>
- Gullickson, R. 1994. Reference Data Sheet on Formaldehyde. <http://www.meridianeng.com>. Tanggal akses 29 April 2008
- Heck, H.D. and M. Cassanova. 1990. Formaldehyde toxicity—new understandings. *Crit. Rev. Toxicol.* 21(6):397-426
- Hoeijmakers, J. H. 2001. Genome Maintenance Mechanisms for Preventing Cancer. *Nature*. 2001 May 17; 411(6835): 366-74. Review.
- Jones C. B., J. McIntosh, H. Huang, A. Graystock, and D. G. Hoyt. 2001. Regulation of Bleomycin-Induced DNA Breakage and Chromatin Structure in Lung Endothelial Cells by Integrins and Poly(ADP-Ribose) Polymerase. *Mol Pharm*, Vol. 59, Issue 1, 69-75
- Kane, A. S. 2004. Toxic Effects, Factors and Interactions. <http://aquaticpath.umd.edu>. Tanggal akses 8 April 2008

- Kim, M. Y., T. Zhang and W. L. Krauss. 2005. Poly(ADP-ribosylation) by PARP-1: ‘PAR-laying’ NAD⁺ into a nuclear signal. *Genes Dev* 2005 19: 1951-1967
- Kobilinsky, L. F., T. F. Liotti and J. Oeser-Sweat. 2005. *DNA : Forensic and Legal Applications*. John Wiley & Sons, Inc. Hoboken, New Jersey. 81-83
- Masutani M., Gunji, A., Tsutsumi, M., Ogawa, K., Kamada, N., Shirai, T., Jishage, K., Nakagama, H., and Sugimura, T. Role of poly-ADP-ribosylation in cancer development. In: Burkle A (ed), Poly(ADP-ribosyl)ation. Georgetown, Texas, USA, Eurekah. Com., pp 1-15, 2005
- Melcher, U. 1998. Southern Blot and Hybridization. <http://biochem4.okstate.edu/>. Tanggal akses 24 Maret 2008 pukul 16.01
- Mulyani, S. 2003. *Studi Keamanan Pangan Ikan Teri Kering (Stolephorus sp.) di Kabupaten Pasuruan Jawa Timur (Kajian Residu Pestisida, Formalin, dan Hubungannya dengan Sifat Kimia, Fisik, dan Organoleptik)*. Universitas Brawijaya. Malang
- Murray, R. K., D. K. Granner, P. A. Mayes, and V. W. Rodwell. 2001. Biokimia Harper Edisi 25. Penerbit Buku Kedokteran EGC. Jakarta
- Menissier-de Murcia, J.M., Niedergang, C., Trucco, C., Ricoul, M., Dutrillaux, B., Mark, M., Oliver, F.J., Masson, M., Dierich, A., and LeMeur, M. et al. 1997. Requirement of Poly(ADP-ribose) Polymerase in Recovery from DNA Damage in Mice and in Cells. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 94: 7303-7307
- Ogura, T. 1990. Striking similarity of the distribution patterns of the poly(ADP-ribose) polymerase and DNA polymerase beta among various mouse organs. *Biochemical Biophysical Research Communications* 172: 377-384

- Pandey, C.K., A. Agarwal, and A. Baronia. 2000. Toxicity of ingested formalin and its management. *Hum. Exp. Toxicol.* 19(6):360-6
- Pleschke, J.M., Kleczkowska, H.E., Strohm, M., and Althaus, F.R. 2000. Poly(ADP-ribose) Polymerase Binds to Specific Domains in DNA Damage Checkpoint Proteins. *J. Biol. Chem.* 275: 40974-40980
- Poirier, G.G., de Murcia, G., Jongstra-Bilen, J., Niedergang, C., and Mandel, P. 1982. Poly(ADP-ribosylation) of Polynucleosomes cause Relaxation of Chromatin Structure. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 79: 3423-3427
- Restani, P. and C.L. Galli. 1991. Oral toxicity of formaldehyde and its derivatives. *Crit. Rev. Toxicol.* 21(5):315-78
- Sherwood, L. 2001. Fisiologi Manusia: dari Sel ke Sistem, Edisi 2. Penerbit Buku Kedokteran EGC. Jakarta
- Shibata, A., Kamada, N., Masumura, K., Nohmi, T., Kobayashi, S., Teraoka, H., Nakagama, H., Sugimura, T., Suzuki, H., and Masutani, M. *Parp-1* deficiency causes an increase of deletion mutations and insertions/rearrangements *in vivo* after treatment with an alkylating agent. *Oncogene*, 24:1328-1337, 2005
- Shiokawa, M., Masutani, M., Fujihara, H., Ueki, K., Nishikawa, R., Sugimura, T., Kubo, H., and Nakagama, H. Genetic alteration of *poly(ADP-ribose) polymerase-1* in human germ cell tumors. *Jpn J Clin Oncol*, 35:97-102, 2005
- Speit, G. and O. Schmid. 2006. Local Genotoxic Effects of Formaldehyde in Humans Measured by The Micronucleus Test with Exfoliated Epithelial Cells. *Science Direct* Volume 613, Issue 1, September 2006, Pages 1-9
- Stratemann, K., W. Bredt, W. Herken, and N. Rietbrock. 1968. The folate content as limiting factor for formate detoxification and

- methanol metabolism. *Naunyn-Schmiedebergs Arch. Exp. Pathol. Pharmakol.* 260:208
- Syvänen, A. 2001. Accessing Genetic Variation: Genotyping Single Nucleotide Polymorphism. *Nature Reviews Genetics* 2, 930-942 (December 2001)
- Tano, H., Fan, K., Kitajima, M., Kasai, K., Hayashi, T., Kondo, M., and Imai, M. 1994. Targetting of HIV-DNA by Probe DNA Beads to Improve PCR Sensitivity. *Int Conf AIDS.* 1994 Aug 7-12; 10: 232
- Teng, S., K. Beard, J. Pourahmad, M. Moridani, E. Easson, and R. Poon. 2001. The formaldehyde metabolic detoxification enzyme system and molecular cytotoxic mechanism in isolated rat hepatocytes. *Chem. Biol. Interact.* 130-132(1-3):285-286
- Thrasher, J.D. and H. Kiliburn. 2001. Embryo toxicity and tetraagenicity of formaldehyde. *Arch. Environ. Health* 56(4):300-311
- Tulin A., D. Stewart and A. C. Spradling. 2002. The *Drosophila* Heterochromatic Gene Encoding Poly(ADP-ribose) Polymerase (PARP) is Required to Modulate Chromatin Structure during Development. *Genes & Dev.*, Vol. 16, No. 16, 2108-2119
- Wang, X., Z. Wang, W. Tong, and Y. Shen. 2006. PARP1 Val762Ala Polymorphism Reduces Enzymatic Activity. *Science Direct*, Volume 354, Issue 1, 2 March 2007, Pages 122-126
- Watson, J.D., J. Tooze., and D.T. Kurtz. 1988. DNA Rekombinan : Suatu pengajaran singkat. Alih bahasa: W. Gunarso. Penerbit erlangga. Jakarta
- Widyaningsih, T. D. dan E. S. Murtini. 2006. *Alternatif Pengganti Formalin pada Produk Pangan*. Trubus Agrisarana. Surabaya

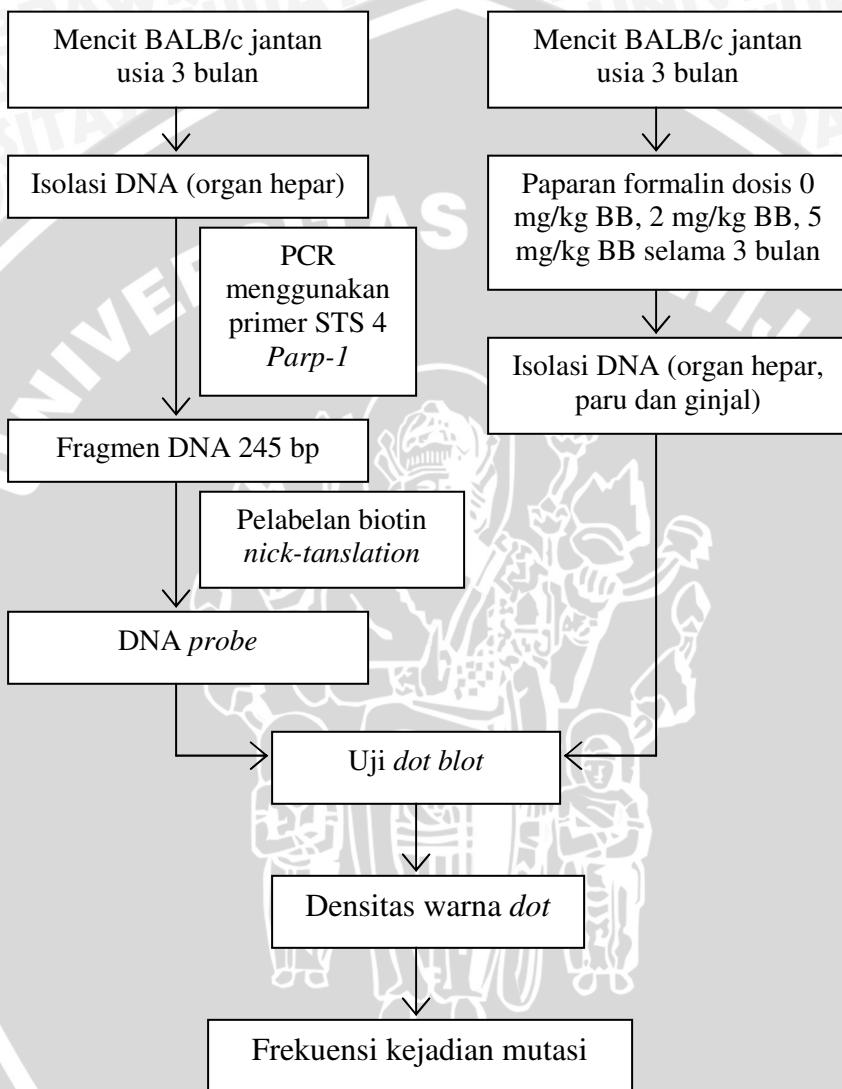
Winnacker, E. L. 1987. *From Genes to Clones, Introduction to Gene Technology*. VCH. Weinheim

Zhou, B. B. and Elledge S. J. 2000. The DNA Damage Response: Putting Checkpoints in Perspective. *Nature*. 2000 Nov 23; 408(6811): 433-9. Review.

Ziegler, M. and Oei, S.L. 2001. A Cellular Survival Switch: Poly(ADP-ribosyl)ation Stimulates DNA Repair and Silences Transcription. *Bioessays* 23: 543-548



Lampiran 1. Alur Penelitian



Lampiran 2. Urutan Gen *Parp-1* Mencit (*Mus musculus*)

LOCUS NC_000067 32280 bp DNA linear
CON 10-JUL-2007
DEFINITION Mus musculus chromosome 1, reference assembly (C57BL/6J).
ACCESSION NC_000067 REGION: 182499106..182531385
VERSION NC_000067.5 GI:149288852
PROJECT GenomeProject:169
KEYWORDS .
SOURCE Mus musculus (house mouse)
ORGANISM Mus musculus
Eukaryota; Metazoa; Chordata; Craniata;
Vertebrata; Euteleostomi; Mammalia; Eutheria;
Euarchontoglires; Glires; Rodentia;
Sciurognathi; Muroidea; Muridae; Murinae;
Mus.
FEATURES Location/Qualifiers
source 1..32280
/organism="Mus musculus"
/mol_type="genomic DNA"
/strain="C57BL/6J"
/db_xref="taxon:10090"
/chromosome="1"
STS 31762..32006
/standard_name="RH126937"
/db_xref="UniSTS:207259"
STS 32055..32141
/standard_name="AI893648"
/db_xref="UniSTS:178531"
gene 1..32280
/gene="Parp1"
/note="Derived by automated computational analysis using gene prediction method: BestRefseq. Supporting evidence includes similarity to: 1 mRNA"
/db_xref="GeneID:11545"
/db_xref="MGI:1340806"
mRNA join(1..179, 4678..4843, 8609..8724,
10180..10394, 11559..11661, 13784..13900,
14756..14932, 16869..17016, 18287..18427,
18947..19186, 19385..19453, 19676..19808,
20424..20619, 22244..22372, 23874..23957,
25069..25191, 25681..25809, 28316..28414,
29237..29389, 29979..30106, 30619..30680,
31122..31236, 31476..32280)
/gene="Parp1"

/product="poly (ADP-ribose) polymerase family, member 1"
/exception="unclassified transcription discrepancy"
/note="Derived by automated computational analysis using gene prediction method: BestRefseq.
Supporting evidence includes similarity to: 1 mRNA"
/transcript_id="[NM_007415.2](#)"
/db_xref="GI:20806108"
/db_xref="GeneID:[11545](#)"
/db_xref="MGI:[1340806](#)"
join (60..179,4678..4843,8609..8724,
10180..10394,11559..11661,13784..13900,
14756..14932,16869..17016,18287..18427,
18947..19186,19385..19453,19676..19808,
20424..20619,22244..22372,23874..23957,
25069..25191,25681..25809,28316..28414,
29237..29389,29979..30106,30619..30680,
31122..31236,31476..31557)
/gene="Parp1"
/GO_component="intracellular; nucleus"
/GO_function="DNA binding; metal ion binding; NAD binding;
NAD+ ADP-ribosyltransferase activity; protein binding; transferase activity; transferase activity, transferring glycosyl groups; zinc ion binding"
/GO_process="base-excision repair; DNA metabolism; DNA repair; protein amino acid ADP-ribosylation; regulation of growth rate; response to DNA damage stimulus; telomere maintenance"
/note="ADP-ribosyltransferase (NAD+; poly (ADP-ribose) polymerase) 1; ADP-ribosyltransferase (NAD+, poly (ADP-ribose) polymerase) 1"
/codon_start=1
/product="poly (ADP-ribose) polymerase family, member 1"
/protein_id="[NP_031441.2](#)"
/db_xref="GI:20806109"
/db_xref="CCDS:[CCDS15569.1](#)"
/db_xref="GeneID:[11545](#)"
/db_xref="MGI:[1340806](#)"

ORIGIN

31441	tcaactgttg	gctccttgac	aactgcctc	cccaggtaca
ttgtctacga	cattgctca			
31501	gtgaatctca	aatacctgct	gaaactcaag	ttcaatttttta
agacateccc	gtggtaaagt			
31561	gcgagggttg	ggctgtgcc	agcacccagg	gcctaggggg
caattctccc	tagtcctct			
31621	gcaccagaca	ccacaaaacc	tcagccatgc	tgccggcgaa
gggtggcccc	ctcaccgaat			
31681	ctccttagga	agggttttat	acagacaggt	taaaggggctc
tggtttcaag	tcccttgtcc			
31741	atgtgcact	ggggcaggcc	ggttgttgt	ggttgtctc
accagccaca	gttccataga			
31801	cagcagctgg	cagtagagca	aaagtgggg	agaggatttt
gttggggcc	tagactagtc			
31861	ctgagggaaag	aaacaccacg	tcacagtac	gatgtctgcc
ttactggctt	ccccagggaa			
31921	ggaaaaaatgt	gcttctccc	tttttcaag	ggttcatctt
tgccttaatt	ttggcaaaat			
31981	gttaagcatt	tattttgagc	aaaaataaa	agttaatttc
atactatata	gattttcttt			
32041	tttatcttgt	atgtccccct	cttagtctgc	tgagcttttg
tttgcttgg	tttcagtga			
32101	tagacatggg	atagccaaaa	gaagggacta	cctgaaaccc
ctaactgggg	cgactgagcc			
32161	tgtatgttgg	tcagttcaaa	gttgcatttgc	ggattctatg
tcttccaaat	tgaaccgtct			
32221	gtaatcgtta	cagccaccca	aagggtata	gttctcaatt
aaaatgc当地	ttggatatactta//			

Keterangan:  = tempat penempelan primer forward

 = primer reverse

Lampiran 3. Data Densitas Warna Hasil *Dot blot*

Membran I

Dosis perlakuan formalin	Dot ke-	Densitas warna (INT/mm ²)		
		Hepar	Paru	Ginjal
0 mg/kg BB	I	4014242	4109354	4141686
	II	4175268	4309422	4232459
	III	4187861	4368886	4293229
	IV	4174839	4330861	4414490
2 mg/kg BB	I	4098684	4020273	3994970
	II	4117355	4262345	4255008
	III	4169175	4417418	4344842
	IV	4211300	4329751	4247841
5 mg/kg BB	I	4065436	4106295	4374256
	II	4377229	4151349	4263941
	III	4185856	4319523	4492499
	IV	4089042	4348023	4639203
Blanko		451731		

Membran II

Dosis perlakuan formalin	Dot ke-	Densitas warna (INT/mm ²)		
		Hepar	Paru	Ginjal
0 mg/kg BB	I	5301984	5207886	5348612
	II	5358718	5221052	5711261
	III	5126134	5384931	5524016
	IV	4899244	5039572	5305308
2 mg/kg BB	I	4985075	4897561	5354659
	II	5072457	5341188	5418763
	III	4769816	5486589	5586981
	IV	4729362	5154908	5340854
5 mg/kg BB	I	5172354	5049617	5174231
	II	5097247	5312790	5371469
	III	4934409	5358893	5402861
	IV	4635040	5404008	5305217
Blanko		5574750		

**Lampiran 4. Standar Nilai Acuan Penilaian Mutasi Pada Sampel
(Menggunakan Perlakuan Formalin 0 mg/kg BB)**

Ulangan	Densitas warna (INT/mm ²)		
	Hepar	Paru	Ginjal
I	4180000	4330000	4290000
II	4890000	5380000	5340000

Lampiran 5. Penghitungan Frekuensi Kejadian Mutasi

Dosis perlakuan formalin	Ulangan	Hepar		Paru		Ginjal	
		Jumlah mutasi / Total jumlah kejadian	Frek. kejadian mutasi (%)	Jumlah mutasi / Total jumlah kejadian	Frek. kejadian mutasi (%)	Jumlah mutasi / Total jumlah kejadian	Frek. kejadian mutasi (%)
2 mg/kg BB	I	1/4	$3/8 \times 100\% = 37,5\%$	1/4	$2/8 \times 100\% = 25\%$	1/4	$3/7 \times 100\% = 43\%$
	II	2/4		1/4		2/3	
5 mg/kg BB	I	1/4	$4/8 \times 100\% = 50\%$	1/4	$2/8 \times 100\% = 25\%$	2/3	$4/7 \times 100\% = 57\%$
	II	3/4		1/4		2/4	

Lampiran 6. Komposisi Bahan

Larutan	Bahan
TBE 1x (pH 8,0)	1 M Tris base, 1 M boric acid, 20 mM Na ₂ EDTA dilarutkan dengan dH ₂ O sampai 1 L
<i>Loading dye</i>	50% Glicerol, 1 mM Na ₂ EDTA, 0,4% bromophenol blue dilarutkan dengan dH ₂ O sampai 1 ml
AEC (<i>Amino Ethyl Carbazole stock solution</i>)	0,4 g AEC dilarutkan dalam 100 ml dimethylformamide (DMF). Sebelum dipakai, 0,67 ml AEC <i>stock solution</i> ditambah 10 ml 0,1 M Na-asetat (pH 5,2), distirer dan disaring, ditambah 10 µl 30% H ₂ O ₂
20xSSC (pH 7,0)	175,3 g NaCl, 88,2 g sodium citrate, dilarutkan dengan dH ₂ O sampai 1 L
PBS 1x	3,8 g NaCl, 0,55 g Na ₂ HPO ₄ , 0,35 g NaH ₂ PO ₄ dilarutkan dengan dH ₂ O sampai 1 L