

**DENTINO**  
**JURNAL KEDOKTERAN GIGI**  
**Vol I. No 1. Maret 2016**

**Laporan Penelitian**

**ANALISIS SITOGENIK MIKRONUKLEUS MUKOSA BUKAL PADA PEROKOK  
AKTIF DAN PASIF**

**Noryunita Rahmah, Nurdiana Dewi, Suka Dwi Rahardja**

Program Studi Kedokteran Gigi Fakultas Kedokteran Universitas Lambung Mangkurat Banjarmasin

**ABSTRACT**

**Background:** Smoking is well known as a habit that negatively impact both smokers and non-smokers but inhaling cigarette smoke or passive smokers. Nicotin compounds of cigarette and cigarette smoke are one of genotoxic compounds that will be nitrosated and form nitrosamines compound that may cause the damage of DNA. DNA damage which is caused by genotoxic compound will be manifested as micronucleus, a second nucleus smaller than the original nucleus. **Purpose:** This study aims to identify whether the number of micronucleus in active smokers was higher than passive smokers. **Method:** This study was observational research with cross-sectional approach with primary data, which was oral buccal mucosa swab of active and passive smokers. The total sample is 30 for each group. **Results:** The results of this study showed average *number of active and passive smokers' buccal micronucleus were  $19,60 \pm 1,81$  and  $14,47 \pm 1,61$* . Mann Whitney test results showed there was significant difference of number micronucleus between active and passive smokers ( $p=0,000$ ). **Conclusion:** Based on this study it can be concluded the number of buccal micronucleus on active smokers was higher than passive smokers

**Keywords :** buccal micronucleus, active smokers, passive smokers

**ABSTRAK**

**Latar belakang:** Merokok merupakan salah satu kebiasaan yang dapat memberikan dampak negatif baik bagi penghisapnya maupun orang yang tidak merokok, tetapi menghirup asap rokok, atau biasa dikenal dengan perokok pasif. Kandungan nikotin pada rokok dan asap rokok merupakan salah satu senyawa genotoksik yang akan mengalami nitrosasi menjadi senyawa nitrosamin yang dapat menyebabkan kerusakan DNA. Kerusakan DNA akibat paparan genotoksik dapat bermanifestasi sebagai mikronukleus, yaitu inti sel kedua yang berukuran lebih kecil dari inti sel sejati. **Tujuan:** Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui apakah rata-rata jumlah mikronukleus pada perokok aktif lebih tinggi dibanding perokok pasif. **Metode:** Penelitian ini merupakan penelitian observasional dengan pendekatan cross-sectional yang menggunakan data primer yaitu preparat swab mukosa bukal dari kelompok perokok aktif dan pasif. Jumlah sampel masing-masing kelompok adalah 30 orang. **Hasil:** Hasil penelitian ini menunjukkan rata-rata jumlah mikronukleus mukosa bukal pada perokok aktif dan pasif adalah  $19,60 \pm 1,81$  dan  $14,47 \pm 1,61$ . Uji statistik Mann Whitney menunjukkan perbedaan yang signifikan antara perokok aktif dan pasif ( $p=0,000$ ). **Kesimpulan:** Berdasarkan penelitian yang dilakukan dapat diambil kesimpulan bahwa rata-rata jumlah mikronukleus mukosa bukal pada perokok aktif lebih tinggi dibanding perokok pasif

**Kata-kata kunci :** mikronukleus mukosa bukal, perokok aktif, perokok pasif

**Korespondensi:** Noryunita Rahmah, Program Studi Kedokteran Gigi, Fakultas Kedokteran Universitas Lambung Mangkurat, Jl. Veteran 128B, Banjarmasin 70429, Kalimantan Selatan, e-mail: r.noryunita@gmail.com

---

## PENDAHULUAN

Kanker rongga mulut merupakan kanker yang paling sering terjadi dan menempati urutan ke-6 hingga ke-8 dari seluruh kanker di dunia. Kanker rongga mulut yang paling sering terjadi adalah karsinoma sel skuamosa, yaitu sekitar 90% dari seluruh kanker rongga mulut dan lokasi yang paling sering terkena adalah lidah, orofaring, bibir, dasar mulut, gusi, palatum keras, dan mukosa bukal. Risiko kanker rongga mulut meningkat dekade ini di beberapa negara, terutama di kalangan perokok.<sup>1,2,3</sup> Karsinogenesis pada rongga mulut merupakan proses bertahap dari akumulasi kerusakan genetik yang menuju ke arah disregulasi sel dengan gangguan sinyal pada sel, perbaikan DNA, dan siklus sel yang penting dalam homeostasis. Kanker rongga mulut dapat timbul akibat adanya substansi mutagenik yang menyebabkan perubahan genetik molekuler pada beberapa kromosom dan gen, misalnya merokok dan konsumsi alkohol.<sup>1,4</sup>

Merokok memiliki dampak negatif bagi penghisapnya maupun bagi orang yang tidak merokok namun menghirup asap rokok, atau disebut perokok pasif. Menurut IARC berdasarkan sidang WHO A Review Of Evidence On SHS And Cancer In 2002, paparan asap rokok dapat meningkatkan risiko kanker paru sebanyak 20-30% pada non perokok.<sup>5</sup> Karsinogen utama pada rokok dan asap rokok adalah benzo(a)piren dan nitrosamin (Tobacco-Specific Nitrosamin/TSNa). N-nitrosornicotine (NNN) dan 4-methyl-N-nitrosamino-1-(3-pyridyl)-1-butanone (NNK) adalah dua derivat utama TSNa yang memiliki potensi karsinogenik. Komponen ini merupakan hasil aktivitas enzimatis nikotin. Benzo(a)piren dan nitrosamin dimetabolisme menjadi molekul aktif oleh sitokrom P450 dan zat antaranya didetoksifikasi oleh glutathion s-transferase menjadi substansi konjugat yang hidrofil dan non toksik. Jika detoksifikasi tidak terjadi, produk metabolit aktif dari rokok dapat menyebabkan DNA adduct dan selanjutnya menginduksi pembentukan mikronukleus.<sup>4,6,7</sup>

Mikronukleus merupakan suatu massa dengan struktur seperti nukleus namun berukuran kecil yang berada di dalam sitoplasma. Mikronukleus berasal dari fragmen atau keseluruhan kromosom yang gagal tertarik ke kutub oleh benang spindel pada saat mitosis dan tetap mengalami proses pembentukan membran inti pada fase telofase sehingga mikronukleus terbentuk terpisah sempurna dari inti sel yang sesungguhnya (nukleus).<sup>8,9</sup> Mikronukleus hanya terbentuk pada stratum basalis mukosa mulut, tetapi adanya migrasi sel dari stratum basalis menuju lapisan yang lebih superfisial menyebabkan gambaran mikronukleus dapat dijumpai pada epitel mukosa mulut yang terlepas.<sup>10</sup>

Penelitian tentang mikronukleus telah dilakukan sebelumnya, antara lain penelitian oleh Casartelli et al pada lesi pra ganas dan karsinoma sel skuamosa, serta penelitian oleh Naderi et al pada perokok dengan membandingkan lama riwayat merokok.<sup>11,12</sup> Belum ada penelitian yang meneliti perbedaan jumlah mikronukleus mukosa bukal pada perokok aktif dan pasif. Berdasarkan hal-hal tersebut peneliti ingin melakukan penelitian mengenai rata-rata jumlah mikronukleus mukosa bukal pada perokok aktif dan pasif. Tujuan penelitian ini adalah untuk mengetahui apakah jumlah mikronukleus mukosa bukal pada perokok aktif lebih tinggi dibanding perokok pasif.

## BAHAN DAN METODE

Jenis penelitian adalah penelitian kuantitatif. Metode penelitian yang digunakan adalah observasional analitik dengan pendekatan cross sectional. Populasi target penelitian meliputi semua perokok aktif dan pasif. Karena populasi merupakan populasi tak hingga, maka sampel dipilih dengan teknik nonprobability sampling, yaitu consecutive sampling. Pada consecutive sampling sampel penelitian dipilih berdasarkan kriteria yang telah ditetapkan baik kriteria inklusi maupun eksklusi. Semua sampel yang memenuhi syarat akan dijadikan sampel penelitian sampai jumlah sampel yang dibutuhkan terpenuhi serta berdasarkan waktu pengumpulan yang tersedia.<sup>13</sup> Jumlah sampel pada penelitian ini adalah 60 orang dengan tiap-tiap kelompok masing-masing 30 orang. Hal ini didasari bahwa penelitian jenis perbandingan (comparation) menurut Gay dan Diehl jumlah sampel yang diperlukan minimal 30 subjek per kelompok.<sup>14</sup> Kriteria inklusi untuk subjek perokok aktif dalam penelitian ini adalah jenis kelamin laki-laki, usia minimal 20 tahun, kriteria OHI-s minimal cukup, mengkonsumsi rokok minimal 10 batang per hari, dan lama merokok minimal 5 tahun. Sedangkan kriteria inklusi untuk perokok aktif adalah usia minimal 20 tahun, kriteria OHI-s minimal cukup, tidak merokok dan minimal terpapar asap rokok sekitar 20 menit per hari, dan riwayat terpapar minimal 5 tahun. Adapun kriteria eksklusi dalam penelitian ini adalah subjek yang melakukan foto rontgen minimal 6 bulan terakhir, memiliki penyakit sistemik (diabetes melitus dan kanker), mengkonsumsi obat-obatan tertentu (pioglitazone dan glimepiride), dan tidak bersedia menjadi sampel penelitian.

Alat dan bahan yang digunakan dalam penelitian ini terdiri dari cytobrush, gelas objek, cover glass, tempat penyimpanan gelas objek, mikroskop cahaya, handy counter, lembar informed consent, alat tulis, larutan fiksatif metanol-asetat (3:1), air, dan bahan pengecatan Papanicolaou. Prosedur penelitian diawali dengan pengenalan,

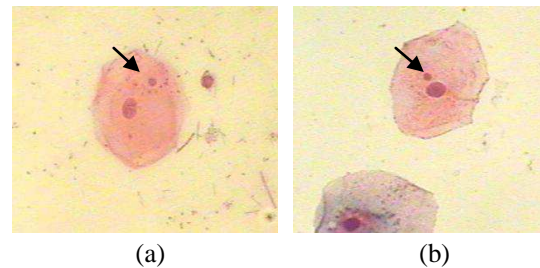
wawancara, dan pengisian informed consent pada subjek penelitian. Selanjutnya dilakukan pengambilan swab mukosa bukal pada subjek penelitian yang diawali dengan berkumur-kumur dengan air putih satu gelas 250 cc untuk menghilangkan debris di rongga mulut. Swab sel-sel epitel mukosa bukal diambil dengan metode smear menggunakan cytobrush yang sudah dibasahi dengan air sekurang-kurangnya 360° pada mukosa bukal kanan dan kiri. Hasil swab mukosa bukal pada cytobrush kemudian diusapkan pada gelas objek dengan cara memutar cytobrush berlawanan arah dengan arah putaran pengusapan pada mukosa bukal rongga mulut sebelumnya. Sel-sel epitel pada gelas objek kemudian difiksasi menggunakan larutan fiksatif metanol-asetat (3:1).

Tahapan selanjutnya adalah pengecatan preparat dengan metode Papanicolau. Preparat yang sudah dicat kemudian diamati di bawah mikroskop cahaya dengan perbesaran 400x. Sebelum diinterpretasi, sel yang dimasukkan dalam kriteria perhitungan harus sesuai parameter Tolbert et al untuk bisa dilakukan skoring. Preparat yang telah memenuhi parameter kemudian diidentifikasi menurut kriteria Tolbert et al, yaitu ukurannya kurang dari sepertiga diameter nukleus tetapi cukup besar untuk bisa dilihat baik bentuk maupun warnanya, intensitas warna dan teksturnya mirip dengan nukleus, tekstur dan bidang fokus sama dengan nukleus, tidak menyatu dengan inti sel, tidak bertumpukan atau seolah memiliki jembatan dengan nukleus.

Mikronukleus yang teridentifikasi dan sesuai kriteria dihitung dengan bantuan handy counter. Jumlah mikronukleus ditulis dalam satuan per 1000 sel yang dihitung. Anomali nukleus yang lain selain mikronukleus seperti nukleus piknotik, karyolytic, karyorhetic, nuclear bud (broken eggs), dan binucleated cell tidak dihitung.

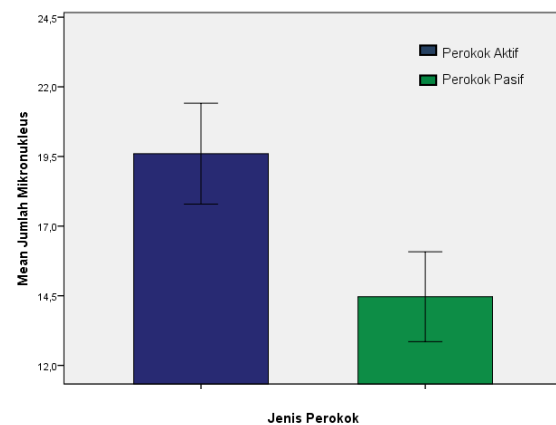
## HASIL PENELITIAN

Berdasarkan pengamatan dengan perbesaran 400x di bawah mikroskop pada preparat hasil swab mukosa bukal, didapatkan gambaran mikronukleus sebagai suatu massa yang mirip dengan nukleus, ukurannya sepertiga sampai dua pertiga diameter nukleus tetapi cukup besar untuk bisa dilihat baik bentuk dan warnanya, intensitas warna dan tekstur mirip dengan nukleus, tidak menyatu dengan nukleus, dan tidak bertumpuk atau seolah memiliki jembatan dengan nukleus, seperti pada Gambar 1.



Gambar 1 Gambaran mikronukleus pada preparat perokok aktif (a), gambaran mikronukleus pada preparat perokok pasif (b)

Data jumlah mikronukleus pada perokok aktif dan pasif yang terkumpul dianalisis dengan bantuan program IBM SPSS Statistic 21. Hasil uji normalitas menggunakan Shapiro Wilk untuk kelompok perokok aktif menunjukkan nilai  $p = 0,000$  ( $p < 0,05$ ) dan untuk kelompok perokok pasif  $p = 0,005$  ( $p < 0,05$ ) yang berarti distribusi data frekuensi mikronukleus pada kedua kelompok tidak normal. Hasil penelitian selanjutnya diuji dengan uji non parametrik Mann Whitney karena hasil uji normalitas menunjukkan data tidak terdistribusi normal. Berdasarkan hasil uji non parametrik, didapatkan hasil uji Mann Whitney nilai  $p = 0,000$  ( $p < 0,05$ ) yang berarti terdapat perbedaan bermakna antara jumlah mikronukleus kelompok perokok aktif dan perokok pasif.



Gambar 2 Diagram jumlah mikronukleus pada perokok aktif dan pasif

Hasil penelitian menunjukkan rata-rata jumlah mikronukleus pada perokok aktif lebih tinggi dibandingkan perokok pasif dengan rata-rata jumlah mikronukleus perokok aktif adalah  $19,60 \pm 1,81$  dan perokok pasif adalah  $14,47 \pm 1,61$  (Gambar 2). Selain itu, berdasarkan lama paparan, subkelompok dengan lama paparan  $> 10$  tahun memiliki rata-rata jumlah mikronukleus mukosa bukal lebih tinggi dibanding lama paparan  $< 10$  tahun pada masing-masing kelompok baik perokok aktif maupun perokok pasif, seperti yang tercantum pada Tabel 1.

Tabel 1. Rata-rata jumlah mikronukleus subkelompok lama paparan

	Perokok Aktif		Perokok Pasif	
	< 10 tahun	> 10 tahun	< 10 tahun	> 10 tahun
Rata-rata jumlah mikronukleus	18,43	19,96	14,06	15,00

## PEMBAHASAN

Mikronukleus didefinisikan sebagai suatu massa dengan struktur seperti nukleus berukuran kecil dekat dengan nukleus sesungguhnya dan berada di dalam sitoplasma.<sup>8</sup> Mikronukleus terbentuk karena adanya abnormalitas kromosom, yaitu ketika sel akan mengalami proses pembelahan pada anafase, fragmen kromosom atau keseluruhan kromosom gagal tertarik oleh benang spindel ke kutub yang berseberangan sehingga kromosom yang gagal tertarik oleh benang spindel tersebut tetap mengalami proses pembentukan membran inti pada telofase lalu terbentuk terpisah sempurna nukleus di dalam sitoplasma. Frekuensi mikronukleus pada orang normal adalah antara 0,05-11,5 per 1000 sel.<sup>15,16</sup> Berdasarkan beberapa penelitian, adanya paparan dari beberapa faktor seperti radiasi dan zat kimia, konsumsi alkohol dan tembakau (merokok, menginang), serta produk metabolik berbahaya seperti Reactive Oxygen Species (ROS) dapat meningkatkan jumlah mikronukleus.<sup>17</sup>

Berdasarkan hasil penelitian ini, dapat terlihat bahwa rata-rata jumlah mikronukleus pada perokok aktif lebih tinggi dibandingkan perokok pasif. Rata-rata jumlah mikronukleus mukosa bukal pada kedua kelompok mengalami peningkatan seiring dengan bertambahnya lama paparan. Hal tersebut sesuai dengan oleh beberapa penelitian terdahulu, yaitu penelitian Naderi et al yang menunjukkan bahwa rata-rata jumlah mikronukleus mukosa bukal pada perokok lebih tinggi secara signifikan dibandingkan non perokok dan prevalensi mikronukleus lebih tinggi pada perokok dengan riwayat merokok lebih dari 10 tahun dibanding dengan perokok dengan riwayat merokok kurang dari 10 tahun meskipun tidak berbeda secara signifikan. Penelitian Palaskar et al juga menunjukkan bahwa efek genotoksik dari merokok dapat meningkatkan jumlah mikronukleus secara signifikan, yaitu dengan rata-rata 22,07 mikronukleus per 1000 sel.<sup>7,12</sup>

Tingginya rata-rata jumlah mikronukleus pada perokok aktif dibandingkan perokok pasif kemungkinan disebabkan oleh beberapa hal, diantaranya adalah karena adanya perbedaan

jumlah paparan bahan genotoksik yang diterima oleh perokok aktif maupun perokok pasif. Perokok aktif menerima jumlah paparan bahan genotoksik yang lebih banyak dibandingkan perokok pasif, karena sumber bahan genotoksik yang diterima perokok aktif tidak hanya berasal dari rokok, tetapi juga berasal dari asap rokok yang dihasilkan dari kegiatan merokok. Hal tersebut didukung oleh teori yang menyebutkan bahwa komposisi kimia yang terkandung pada kedua jenis asap rokok, yaitu mainstream smoke (asap rokok yang berasal dari mulut perokok) dan sidestream smoke (asap rokok yang berasal dari ujung rokok yang terbakar) relatif sama dan keduanya sama-sama mengandung zat-zat karsinogenik tetapi dalam konsentrasi yang berbeda. Perokok yang secara aktif menghirup mainstream smoke dalam jumlah sangat besar mendapatkan zat-zat karsinogen lebih banyak dibandingkan perokok pasif. Selain itu, beberapa enzim seperti aril hidrokarbon hidroksilase dapat memetabolisme hidrokarbon dari tembakau dan mengubahnya menjadi senyawa karsinogen kuat lainnya yang dapat meningkatkan potensi karsinogenik dari benzopiren yang ada pada rokok dan asap rokok. Senyawa ini dapat menginduksi lebih banyak kerusakan DNA.<sup>18,19</sup>

Tingginya rata-rata jumlah mikronukleus pada perokok aktif dibanding perokok pasif kemungkinan dapat pula disebabkan oleh perbedaan daerah yang terpapar. Perokok aktif menerima efek paparan genotoksik secara langsung pada mukosa rongga mulut pada saat merokok maupun tidak langsung secara sistemik pada saat menghirup asap rokok yang dihasilkan pada proses merokok baik berupa mainstream smoke maupun sidestream smoke, sedangkan perokok pasif hanya menerima efek paparan genotoksik secara sistemik pada saat menghirup asap rokok. Hal ini didukung oleh teori yang menyebutkan bahwa ternyata sel-sel bukal secara lokal dapat memetabolisme suatu agen karsinogenik menjadi suatu produk yang reaktif, sedangkan zat karsinogenik spesifik pada tembakau rokok, yaitu NNK memerlukan bantuan sitokrom P450 di hati yang mengaktivasi pembentukan metabolit yang reaktif terhadap DNA.<sup>16,20</sup> Oleh karena itu, kemungkinan kerusakan DNA yang dialami oleh perokok aktif lebih banyak dibanding perokok pasif, yaitu baik kerusakan DNA secara lokal di rongga mulut, maupun sistemik.

Merokok dan menghirup asap rokok dapat menyebabkan kerusakan DNA karena kandungan bahan genotoksiknya seperti benzopiren dan nikotin. Selain bahan-bahan karsinogen pada tembakau, panas yang dihasilkan dari pembakaran rokok dapat menambah aksi yang agresif dari bahan karsinogen pada mukosa rongga mulut.<sup>7,21</sup> Nikotin yang ternitrosasi akan menjadi senyawa-senyawa nitrosamin yang berbahaya menurut IARC dapat menghasilkan DNA adduct baik melalui jalur metilasi maupun hidroksilasi.<sup>22,23</sup> DNA adduct

selanjutnya dapat menginduksi terbentuknya mikronukleus, yaitu suatu massa dengan struktur seperti nukleus berukuran kecil dekat dengan nukleus sesungguhnya, berada di dalam sitoplasma, dan terbentuk karena adanya abnormalitas kromosom pada fase pembelahan sel, yaitu anafase. Kerusakan kromosom yang disebabkan oleh zat genotoksik pada sel-sel basal dapat dilihat dalam bentuk mikronukleus yang bermigrasi ke lapisan epitel di atasnya hingga akhirnya tereksfoliasi. Frekuensi mikronukleus merupakan ukuran kerusakan kromosom pada awal pembelahan sel dan jumlah mikronukleus berhubungan dengan stimuli karsinogenik, sebelum perkembangan gejala klinis, yaitu kejadian premalignan dan malignan.<sup>8,24,25</sup>

Belum ada penelitian mengenai angka rata-rata jumlah mikronukleus yang dapat dijadikan indikator akan terjadinya suatu perkembangan ke arah lesi pre malignan. Namun, hasil penelitian Sivasankari et al mengenai jumlah mikronukleus pada perokok dengan lesi pre malignan dan malignan menunjukkan bahwa rata-rata jumlah mikronukleus pada perokok dengan lesi pre malignan adalah 55 per 500 sel dan pada perokok dengan lesi malignan adalah 142 per 500 sel. Sedangkan penelitian mengenai jumlah mikronukleus pada kondisi pre malignan dan malignan pada perokok pasif belum ditemukan.<sup>26</sup>

Berdasarkan penelitian ini, dapat disimpulkan bahwa rata-rata jumlah mikronukleus mukosa bukal pada perokok aktif lebih tinggi dibandingkan perokok pasif yaitu sebesar  $19,60 \pm 1,81$  pada perokok aktif dan  $14,47 \pm 1,61$  pada perokok pasif. Penelitian selanjutnya dapat dilakukan dengan karakteristik yang lebih spesifik misalnya dari jenis rokok yang digunakan dan batasan umur sampel, serta menggunakan metode pewarnaan Fielgen Fast Green. Selain itu juga perlu dilakukan penelitian lebih lanjut mengenai kerusakan gen spesifik yang menyebabkan munculnya mikronukleus akibat paparan genotoksik rokok maupun asap rokok.

#### DAFTAR PUSTAKA

- Bettendorfa O, Piffko J, Ba'nkfalvi A. Prognostic and predictive factors in oral squamous cell cancer: important tools for planning individual therapy?. *Oral Oncology* 2004;40:110-119
- Gandini S, Botteri E, Iodice S et al. Tobacco smoking and cancer: a meta-analysis. *Int J Cancer* 2008;122(1):155-164
- Maroochio LS, Joelma L, Felipe FS, Lusiana C, dan Suzana OM. Oral squamous cell carcinoma: an analysis of 1,564 cases showing advances in early detection. *J Oral Sci* 2010;52(2):267-273
- Warnakulasuria S, Thomas D, Michael MB, Elias CP, Phillip MP, Clemens W et al . Oral health risk of tobacco use and effect of cessation. *International Dental Journal* 2010;60:7-30
- Lyon F. Tobacco smoke and involuntary smoking. *IARC Monographs on the evaluation of carcinogenic risks to humans* 2004(83)
- Bartsch H, Rojas M, Nair U, Alexandrov K. Genetic cancer susceptibility and DNA adducts: studies in smokers, tobacco chewers, and coke oven workers. *Cancer Detect Prev* 1999;23(6):445-453
- Palaskar and Jindal C. Evaluation of micronuclei using papanicolaou and may grunwald giemsa stain in individuals with different tobacco habits – a comparative study. *J Clin Diag Res* 2010;4:3607-3613
- Kahsyap, Bina, Padala SR. micronucleus assay of exfoliated oral buccal cells: means to assess the nucleaur abnormalities in different disease. *J Cancer Res Ther* 2012;8(2):184-191
- Keohavong P, Stephen GG. *Molecular toxicology protocols*. New Jersey: Humana Press Inc., 2005, p.69
- Tolbert PE, C.M. Shy, J.W. Allen. Micronuclei and other nuclear anomalies in buccal smears: methods development. *Mutat Res* 1992;69-77.
- Casartelli G, Bonatti S, De Ferrari M et al. Micronucleus frequencies in exfoliated buccal cells in normal mucosa, precancerous lesions and squamous cell carcinoma. *Anal Quant Cytol Histol* 2000;22:486-92
- Naderi NJ, Sareh F, Samaneh S. Micronucleus assay of buccal mucosa cells in smokers with the history of smoking less and more than 10 years. *Indian J Pathol Microbiol* 2012;55:433-438
- Swarjana IK. Metodologi penelitian kesehatan: tuntunan praktis pembuatan proposal penelitian. Yogyakarta : ANDI, 2012, hal. 102
- Gay LR, PL Diehl. *Research Methods for Business and Management*. Singapore : Prentice Hall, 1996
- Batos-Aires D, Alvaro A, Maria LP, Daniel PM, Alexandra T. Preliminary study of micronuclei levels in oral exfoliated cells from patients with periodontitis. *J Dent Sci* 2013;8:200-204
- Holland N, Claudia B, Micheline K-V, Bonassi S, Zeiger E, Knasmueller S et al. The micronucleus assay in human buccal cells as a tool for biomonitoring DNA damage: the humn project perspective on current status and knowledge gaps. *Mutat Res* 2008;659:93-108

17. Jois HS, Alka DL dan Mohan K. Micronucleus as Potential Biomarker of Oral Carcinogenesis. *IJDA* 2010;2(2):197-202
18. Lodovici M dan Elisabetta B. Biomarkers of induced active and passive smoking damage. *Int. J. Environ. Res. Public Health* 2009;6:874-888
19. Pradeep MR, Yadavalli Guruprasad, Maji Jose, Kartikay Saxena, Deepa K, Vishnudas Prabhu. Comparative Study of Genotoxicity in Different Tobacco Related Habits using Micronucleus Assay in Exfoliated Buccal Epithelial Cells. *J CDR* 2014;8(5): ZC21-ZC24
20. Peterson LA. Formation, repair, and genotoxic properties of bulky DNA adducts formed from tobacco-specific nitrosamines review article. *J Nucleic Acid* 2010:1-11
21. DeMarini, D. M. Genotoxicity of tobacco smoke and tobacco smoke condensate: a review. *Mutation Research* 2004;567:447-474
22. Goodsell DS. The molecular perspective: nicotine and nitrosamines. *The Oncologist* 2004;9:353-354
23. International Agency for Reseach on Cancer Monographs. Some tobacco-specific N-nitrosamines. Exposure Data, volumes 89
24. Kamath VV, Praveen A, Krishnanand S. Micronuclei as prognostic indicators in oral cytological smears: A comparison between smokers and non-smokers. *J Clin Cancer Invest* 2014;3(1):49-54
25. Batos-Aires D, Alvaro A, Maria LP, Daniel PM, Alexandra T. Preliminary study of micronuclei levels in oral exfoliated cells from patients with periodontitis. *J Dent Sci* 2013;8:200-204
26. N Sivasankari P, Sohinder K, Reddy KS, Vivekanandam S, Ramachandra RK. Micronucleus index: an early diagnosis in oral carcinoma. *J Anant Soc India* 2009;57(1):8-13.