

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

Laporan Penelitian

**ANALISIS SITOGENIK MIKRONUKLEUS MUKOSA BUKAL PADA ORANG
MENGINANG DAN TIDAK MENGINANG
(Tinjauan di Kecamatan Lokpaikat Kabupaten Tapin)**

Hilda Ayu Setyawati, Nurdiana Dewi, Ika Kustiyah Oktaviyanti

Program Studi Kedokteran Gigi Fakultas Kedokteran Universitas Lambung Mangkurat, Banjarmasin

ABSTRACT

Background: Betel-Chewing is a habit of chewing betel leaves along with gambier, areca nuts, lime, and tobacco. Areca-nut and tobacco are carcinogenic compounds that can cause DNA damage. DNA damage caused by betel-chewing can manifest as micronucleus. Micronucleus is a second nucleus small sized amount 1/3 until 2/3 from the original nucleus, oval or round shaped, that can be found on the cells with DNA damage. **Purpose:** This study aims to identify an increase on the mean number of micronucleus on betel-chewer compared with non betel-chewer. **Method:** This study was observational research with cross-sectional approach. The total sample were 15 person for betel-chewer group and 15 person for non betel-chewer group based on total sampling technique. **Results:** The results of this study presented the mean number of micronucleus on betel-chewer was 12,33 and non betel-chewer was 6,6. Statistic test of T-test independent presented there was significant difference between betel-chewer group and non betel-chewer group. Based on this study it can be concluded that there was an increase on the mean number of micronucleus on betel-chewer compared with non betel-chewer.

Keywords: micronucleus, betel-chewing

ABSTRAK

Latar belakang: Menginang merupakan suatu kebiasaan mengunyah daun sirih beserta gambir, biji buah pinang, kapur, maupun tembakau. Biji buah pinang dan tembakau merupakan bahan karsinogenik yang dapat menyebabkan kerusakan DNA. Kerusakan DNA akibat menginang dapat bermanifestasi sebagai mikronukleus. Mikronukleus merupakan nukleus kedua berukuran kecil yaitu sekitar 1/3 sampai 2/3 dari inti sel utama, berbentuk oval atau bulat yang ditemukan pada sel dengan kerusakan DNA. **Tujuan:** Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui adanya peningkatan rata-rata jumlah mikronukleus mukosa bukal pada orang menginang dibandingkan orang tidak menginang. **Metode:** Penelitian ini merupakan penelitian observasional dengan pendekatan cross-sectional. Total sampel sebanyak 15 orang untuk kelompok menginang dan 15 orang untuk kelompok bukan menginang dengan teknik pengambilan sampel adalah total sampling. **Hasil:** Hasil penelitian menunjukkan rata-rata jumlah mikronukleus orang menginang adalah $12,33 \pm 4,38$ dan bukan menginang adalah $6,6 \pm 2,38$. Uji statistik T-tidak berpasangan menunjukkan perbedaan yang signifikan antara orang menginang dan tidak menginang ($p=0,000$). **Kesimpulan:** Berdasarkan penelitian ini dapat diambil kesimpulan bahwa terdapat peningkatan rata-rata jumlah mikronukleus mukosa bukal orang menginang dibandingkan orang tidak menginang.

Kata-kata kunci: mikronukleus, menginang

Korespondensi: Hilda Ayu Setyawati, Program Studi Kedokteran Gigi Fakultas Kedokteran Universitas Lambung Mangkurat, Jl. Veteran 128B, Banjarmasin 70249, Kalimantan Selatan, e-mail: cerahhilda08@gmail.com

PENDAHULUAN

Mengunyah sirih atau menginang merupakan salah satu kebiasaan yang masih dilakukan oleh orang lanjut usia terutama di Asia Selatan, Asia Tenggara dan Asia Pasifik.¹ Menginang merupakan salah satu warisan pengetahuan tradisional sebagai nilai-nilai budaya dengan segala keanekaragaman cara dan nilai yang dikandungnya. Kebiasaan menginang di Indonesia sudah dilakukan secara luas sejak zaman dahulu, baik di Jawa, Sumatera, Sulawesi, Maluku maupun Papua.² Masyarakat yang menginang pada umumnya menganggap bahwa menginang merupakan kebutuhan yang setara dengan kebutuhan pangan dan banyak dilakukan oleh para wanita lanjut usia. Kebiasaan menginang ternyata berdampak negatif bagi kesehatan karena bahan-bahan yang digunakan pada saat menginang mampu menyebabkan adanya kerusakan DNA.³

International Agency for Research on Cancer (IARC) pada tahun 2004 menyebutkan bahwa menginang bersifat karsinogenik bagi manusia yang kemudian dikaitkan dengan onset awal terbentuknya tumor dan menjadi keganasan.^{4,5,6} Studi kimia menunjukkan bahwa komponen menginang yaitu pinang, mengandung alkaloids sebesar 0,15-0,67%.⁷ Komponen alkaloid serta polyphenol terdapat dalam bahan menginang dan juga sebagai hasil reaksi dari campuran bahan-bahan menginang di dalam rongga mulut seperti N-nitrosamin yang dapat menyebabkan kerusakan DNA serta menghambat aktivitas protein.^{8,9} Hal ini merupakan awal terbentuknya mikronukleus.³

Mikronukleus merupakan nukleus kedua berukuran kecil yaitu sekitar 1/3 sampai 2/3 dari inti sel utama, berbentuk oval atau bulat yang ditemukan pada sel dengan kerusakan DNA. Sel yang mengandung mikronukleus terbentuk pada saat mitosis fase anafase.¹⁰ Menginang dengan bahan-bahan berupa tembakau serta biji buah pinang selama proses pengunyahan mampu menghasilkan senyawa-senyawa yang mampu menimbulkan kerusakan DNA akibat terjadinya metilasi DNA.³

Jumlah mikronukleus di mukosa bukal umumnya meningkat pada orang dengan adanya kerusakan DNA. Penelitian mikronukleus pada penguin terbukti mengalami peningkatan khususnya pada penguin dengan jenis kelamin laki-laki.¹¹ Berdasarkan hal di atas, maka peneliti ingin meneliti jumlah mikronukleus mukosa bukal pada penguin di Kecamatan Lokpaikat Kabupaten Tapin.

METODE PENELITIAN

Penelitian ini merupakan penelitian observasional dengan pendekatan cross sectional. Sampel terdiri dari dua kelompok yaitu kelompok

menginang dan bukan penguin. Teknik pengambilan sampel yang digunakan adalah total sampling yaitu seluruh masyarakat menginang di Kecamatan Lokpaikat dijadikan sampel penelitian. Sampel penelitian dipilih apabila memenuhi kriteria inklusi dan eksklusi. Kriteria inklusi dalam penelitian ini adalah pasien dengan kebiasaan menginang dan tidak menginang dan bersedia menjadi responden dengan menandatangani surat persetujuan menjadi responden, sedangkan kriteria eksklusi yaitu pasien mengalami gangguan fungsi kesadaran dan pasien mempunyai riwayat penyakit sistemik. Jumlah sampel yang diperoleh sebesar 15 orang menginang dan 15 orang tidak menginang.

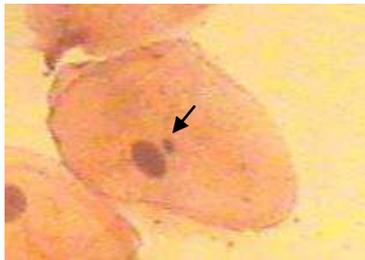
Alat dan bahan yang digunakan dalam penelitian ini terdiri dari cytobrush, gelas objek dan cover glass, kotak gelas objek, mikroskop cahaya, handy counter, fiksatif metanol-asetat (3:1) dan pewarna papanicolaou. Sebelum melakukan penelitian, diperlukan tahap persiapan, yaitu melakukan penelitian pendahuluan. Peneliti lalu membuat dan memperoleh surat izin penelitian dari Fakultas Kedokteran Universitas Lambung Mangkurat dan ethical clearance dari Komite Etik Penelitian Kesehatan Fakultas Kedokteran Universitas Lambung Mangkurat. Setelah mendapatkan izin penelitian dilanjutkan dengan mencari sampel menginang dan tidak menginang di Kecamatan Lokpaikat yang memenuhi kriteria inklusi dan eksklusi. Apabila sampel telah setuju dijadikan sampel penelitian, sampel diminta untuk menandatangani lembar informed consent. Sebelum memulai pengambilan sampel, subjek diminta untuk berkumur dengan air putih satu gelas 250cc untuk menghilangkan debris di rongga mulut. Tiap subjek diambil sediaan dengan metode smear menggunakan cytobrush yang sudah dibasahi dengan air. Pengusapan dilakukan di mukosa bukal dengan cara memutar cytobrush sekurang-kurangnya 360°. Cytobrush diusapkan kembali pada gelas objek agar sel tersebut menempel di plat tersebut. Pengusapan dilakukan dengan cara memutar cytobrush berlawanan dengan arah putaran pengusapan yang sebelumnya dilakukan pada mukosa bukal. Gelas objek yang telah terdapat usapan mukosa bukal diberikan larutan fiksatif metanol-asetat dengan perbandingan 3:1 dengan cara meneteskan cairan tersebut pada gelas objek. Tahap selanjutnya adalah melakukan pengecatan dengan menggunakan pengecatan papanicolaou. Spesimen kemudian diidentifikasi menggunakan mikroskop cahaya dengan perbesaran 400x.

Mikronukleus diinterpretasi sesuai parameter. Parameter menurut Tolbert et al yang harus terpenuhi yaitu sitoplasma sel masih utuh dan posisi sel dalam gelas objek relatif datar, sel yang diamati sedikit atau tidak bertumpukan dengan sel di sebelahnya, nukleus normal dan utuh, perimeter nuklear halus dan terbatas jelas, dan preparat mengandung sedikit atau tidak ada debris sama

sekali.¹¹ Mikronukleus yang teridentifikasi dan sesuai kriteria di atas dihitung dengan bantuan handy counter. Frekuensi mikronukleus ditulis 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. Setelah seluruh preparat diamati, dilakukan analisis data dengan uji normalitas Shapiro-wilk dilanjutkan dengan uji T-tidak berpasangan.

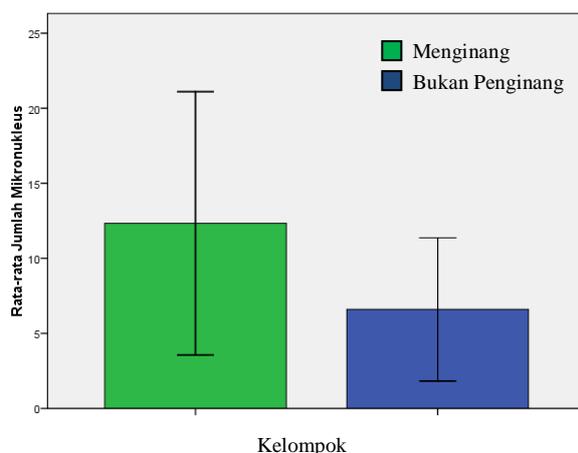
HASIL PENELITIAN

Berdasarkan pengamatan dengan perbesaran 400x pada preparat hasil swab mukosa bukal rongga mulut menunjukkan adanya gambaran mikronukleus yang terlihat sebagai suatu massa mirip dengan nukleus, berukuran 1/3 sampai dengan 2/3 dari nukleus utama, intensitas dan tekstur mirip dengan nukleus, dan tidak bertumpuk dengan nukleus, seperti Gambar 1.



Gambar 1 Gambaran mikronukleus pada orang menginang

Seperti yang terlihat pada Gambar 2, rata-rata jumlah mikronukleus pada orang menginang lebih tinggi dibandingkan orang tidak menginang yaitu sebesar $12,33 \pm 5,33$ pada orang menginang dan $6,6 \pm 2,33$ pada orang tidak menginang.



Gambar 2 Diagram rata-rata jumlah mikronukleus menginang dan bukan penguinang

Hasil perhitungan jumlah mikronukleus dianalisis dengan uji normalitas Shapiro-Wilk yang

dilakukan pada kelompok menginang dan tidak menginang. Hasil uji normalitas didapatkan nilai signifikansi 0,751 untuk kelompok menginang dan 0,375 untuk kelompok tidak menginang sehingga dapat disimpulkan bahwa data terdistribusi normal ($p > 0,05$). Analisis data kemudian dilanjutkan dengan melakukan uji T-tidak berpasangan karena data terdistribusi normal. Berdasarkan uji T-tidak berpasangan didapatkan nilai signifikansi 0,000 ($p < 0,05$) yang artinya terdapat perbedaan yang bermakna antara kelompok menginang dan tidak menginang.

PEMBAHASAN

Menginang merupakan suatu proses mengunyah daun sirih dengan atau tanpa disertai bahan tambahan lainnya. Bahan tambahan lain dapat bervariasi antar kota, daerah, komunitas dan individu. Meskipun begitu bahan yang paling banyak ditambahkan adalah biji buah pinang, kapur, gambir, parutan kelapa, pepermin, kapulaga, cengkeh, pewangi dan stimulant.¹²

Masyarakat yang menginang di Kecamatan Lokpaikat, umumnya menginang dengan menggunakan bahan daun sirih, biji buah pinang, gambir, kapur dan tembakau. Dari 15 orang yang menginang di Kecamatan Lokpaikat, hanya 3 orang yang menginang tidak menggunakan tembakau. Menginang juga sudah menjadi kebiasaan dan membuat ketagihan bagi masyarakat yang menginang di Kecamatan Lokpaikat. Masyarakat yang sudah terbiasa menginang umumnya sulit untuk tidak menginang meskipun hanya satu hari. Masyarakat Lokpaikat yang menginang bahkan memiliki frekuensi menginang yang lebih banyak dibandingkan makan dalam satu hari.

Peningkatan jumlah mikronukleus pada orang menginang kemungkinan disebabkan oleh kombinasi bahan-bahan yang digunakan dalam menginang. Bahan-bahan tersebut adalah tembakau, biji buah pinang, gambir, kapur, dan sirih. Tembakau dan biji buah pinang diduga menjadi penyebab terjadinya peningkatan jumlah mikronukleus.

Biji buah pinang dan tembakau merupakan bahan yang dapat menimbulkan adanya kerusakan DNA. Hal itu disebabkan karena tembakau mengandung senyawa karsinogenik TSNA (tobacco-specific nitrosamines). Mengunyah tembakau bersamaan dengan daun sirih menyebabkan tingginya paparan karsinogenik dari TSNA (tobacco-specific nitrosamines) yaitu sekitar 1000 µg/hari dibandingkan dengan perokok yang hanya mendapatkan paparan TSNA sekitar 20 µg/hari. Tobacco-specific nitrosamines diaktivasi secara metabolik oleh sitokrom P450s dan enzim-enzim lainnya. Karsinogenik utama TSNA (4-(N-methyl-N-nitrosamino)-1-(3-pyridyl)-1-butanone) diaktivasi oleh hidroksilasi metilen sehingga

mengalami penguraian menjadi agen DNA metilase dan membentuk 7-methylguanine, O⁶-methylguanine (O6-MeG) dan O⁶-methylthymidine didalam DNA atau melalui hidrosilasi metil membentuk DNA aduksi pyridyloxobutyl. Selain itu, (4-(N-methyl-N-nitrosamino)-1-(3-pyridyl)-1-butanone) juga dirubah secara metabolisme menjadi 4-(methylnitrosamino)-1-(3-pyridyl)-1-butanol (NNAL-N-oxide) yang juga dapat diaktivasi oleh α -hydroxylation menjadi metil dan aduksi pyridylhydroxybutyl dalam DNA.³

Bahan menginang yang berupa biji buah pinang juga mengandung senyawa karsinogenik berupa Areca nut-specific nitrosamines (ASNA). 3-(methyl-N-nitrosamino)propionitrile (MNPN) dan N-nitrosoguvacoline (NG) merupakan jenis Areca nut-specific nitrosamines (ASNA). Nitrosasi arecoline pada pH netral menyebabkan pembentukan NG empat kali lebih besar dari pada pH asam. N-nitrosoguvacoline (NG) menyebabkan pembentukan DNA single strand breaks dan DNA protein cross link.³

Peningkatan jumlah mikronukleus pada orang menginang kemungkinan juga dipicu dari lamanya melakukan aktivitas menginang. Hasil penelitian yang dilakukan di Kecamatan Lokpaikat menunjukkan bahwa masyarakat yang menginang dengan lama lebih dari 15 tahun memiliki jumlah mikronukleus yang lebih tinggi dibandingkan yang kurang dari 5 tahun. Hal tersebut sesuai dengan penelitian oleh Suddha et al (2009) yang menunjukkan bahwa orang menginang lebih dari 10 tahun memiliki jumlah mikronukleus lebih tinggi dibandingkan dengan penghirup tembakau yang juga lebih dari 10 tahun.⁵

Faktor lain yang dapat memicu peningkatan jumlah mikronukleus adalah usia. Peningkatan rata-rata jumlah mikronukleus pada orang menginang diduga karena sampel orang menginang yang berusia 50-90 tahun sedangkan orang yang tidak menginang berusia 40-60 tahun. Penuaan merupakan bagian dari siklus hidup setiap organisme. Penuaan dikarakteristikan dengan penurunan efisiensi fungsi dan fisiologis yang menghasilkan ketidakseimbangan homeostatik sehingga menyebabkan morbiditas dan mortalitas. Penuaan terjadi karena adanya perubahan fenotipik pada struktur seluler dan nuklear. Kondisi tersebut dapat disebabkan karena defek genetik, defisiensi nutrisi, atau pengaruh eksternal seperti toksin lingkungan. Penuaan menyebabkan peningkatan ketidakstabilan genomik yang dihubungkan dengan penurunan kapasitas repair seluler atau kerusakan DNA.¹³ Penurunan efisiensi proses repair dan akumulasi mutasi akibat kondisi endogen dan eksogen yang berat dapat menyebabkan peningkatan kerusakan DNA, yang mana dalam tingkat sitogenetik, dapat dilihat dengan peningkatan frekuensi kelainan kromosom salah satunya adalah mikronukleus.¹⁴

Berdasarkan penelitian yang telah dilakukan, dapat disimpulkan bahwa rata-rata jumlah mikronukleus orang menginang lebih tinggi dibandingkan orang tidak menginang di Kecamatan Lokpaikat Kabupaten Tapin yaitu sebesar 12,33 pada orang menginang dan 6,6 pada orang bukan penginang. Penelitian selanjutnya dapat dilakukan dengan perbandingan usia sampel yang setara serta menggunakan metode pewarnaan Fielgen Fast Green. Selain itu juga perlu dilakukan penelitian lebih lanjut mengenai kerusakan gen spesifik yang menyebabkan munculnya mikronukleus akibat menginang.

DAFTAR PUSTAKA

1. Gupta PC, Ray CS. Epidemiology of Betel Quid Usage. *Am Acad Med Singapore* 2004;33:31-36
2. Susiarti S. Jenis-jenis pengganti pinang dan gambir dalam aya menginang masyarakat di kawasan taman nasional Wasur, Merauke, Papua. *Biodiversitas* 2005;6(3):217-219
3. Nair U, Helmut B, dan Jagadeesan N. Alert for an epidemic of oral cancer due to use of the betel quid substitutes gutkha and pan masala: a review of agents and causative Mechanisms. *Mutagenesis* 2004;19(4):251-262
4. International Agency for Research on Cancer. Betel-Quid and areca-nut chewing and some areca-nut-derived nitrosamines. *IARC Monographs on The Evaluation of Carcinogenic Risks to Human* 2004;85: 45-46,50,70,78
5. Khan MA, Saleem S, Shahid SM, Hameed A, Qureshi NR, Abbasi Z, et al. Prevalence of oral squamous cell carcinoma (oscc) in relation to different chewing habits in Karachi, Pakistan. *Pakistan Journal Biochemistry and Molecular Biology* 2012;45(2):59-63
6. Ridzuan NB. Kanker rongga mulut disebabkan oleh kebiasaan menyirih. Medan:Skripsi FKG USU. 2009. Hlm.28-29
7. Chen Wu I, Ping-Ho C, Chien-Jen W, Deng-Chyang W, Shih-Meng T, Mu-Rong C, et al. Quantification of blood betel quid alkaloids and urinary 8-hydroxydeoxyguanosine in humans and their association with betel chewing habits. *Journal of Analytical Toxicology* 2010;34:325-331
8. Auluck A, Hislop G, Poh C, Zhang L, Rosin MP. Areca nut and betel quid chewing among south asian immigrants to western countries and its implications for oral cancer screening. *The International Electronic Journal Of Rural And Remote Health* 2009; 9: 1-8.
9. Lee CH, Lee KW, Fang FM, Tsai SM, Chen PH, Wu IC, et al. The neoplastic impact of tobacco-free betel-quid on the histological

- type and the anatomical site of aerodigestive tract cancer. *International Journal of Cancer* 2012; 131: 733-743
10. Jadhav K, Nidhi G, Mujib BRA. Micronuclei: An essential biomarker in oral exfoliated cells for grading of oral squamous cell carcinoma. *J Cytol* 2011; 28(1); 7-12
 11. Kalita H, Dulal CB, Karabi D, dan Rajlakshmi D. Genotoxic Effect on Buccal Epithelial Cells of Betel Quid Chewers by Micronuclei Assay. *Asian J Exp Biol Sci* 2013;4(3):491-494.
 12. Sharan NR, Ravi M, Yashmin C, Kamlesh A. Association of Betel Nut with Carcinogenesis: Revisit with a Clinical Perspective. *Plos One* 2012;7(8):1-21
 13. Thomas P, Harvey S, Gruner T, Fenech M. The buccal cytome and micronucleus frequency is substantially altered in Down's syndrome and normal ageing compared to young healthy controls. *Mutat Res* 2008; 638(1-2): 37-47
 14. Effects of age and gender on micronucleus and chromosome non disjunction frequencies in centenarians and younger subjects. *Mutagenesis* 2007; 22(3): 195-200.