

PENGENALAN TEKNIK FISH UNTUK DETEKSI ABERASI KROMOSOM TRANSLOKASI AKIBAT RADIASI PENGION

Yanti Lusiyanti, Iwiq Indrawati, dan Sofiaty Purnami

Pusat Teknologi Keselamatan dan Metrologi Radiasi – BATAN

- Jalan Cinere Pasar Jumat, Jakarta – 12440
- PO Box 7043 JKSKL, Jakarta – 12070

PENDAHULUAN

Perkembangan teknologi nuklir telah menjadi salah satu penopang pembangunan. Oleh karena itu aplikasi teknologi nuklir dalam segala bidang seperti energi listrik, industri, makanan dan pertanian, kesehatan, perlindungan lingkungan dan lain sebagainya merupakan topik yang sedang hangat dibicarakan. Di Jepang misalnya, sumbangan ekonomi total dari aplikasi teknik nuklir non-energi adalah kurang lebih 45% dari 150 milyar dolar US pada tahun 2000 lalu. Sedangkan di bidang pembangkit listrik, sebagai salah satu contoh, bahwa satu dari tiga lampu di Jepang berasal dari sumber energi nuklir. Di tingkat dunia, energi nuklir pun secara nyata ikut berperan dalam penyediaan listrik sebesar 25% di 17 negara penggunaannya [1]. Pertumbuhan ekonomi terus bertambah di negara-negara sedang berkembang, terutama negara dengan jumlah penduduk sangat besar seperti Indonesia, yang akan terus bertambah kebutuhan ekonomi perkapitanya, juga biaya konsumsi untuk hidup yang lebih baik. Disamping besarnya pemanfaatan teknologi nuklir untuk kesejahteraan manusia, segi keselamatannya pun harus diperhitungkan, bahkan selalu diutamakan sehingga perlu suatu tindakan pemantauan agar dosis radiasi yang diterima seseorang karena pekerjaannya atau tindakan medik untuk diagnosis atau terapi tidak melebihi batas yang diijinkan.

Selama proses penggunaan secara normal maupun saat terjadi kecelakaan radiasi pengion maka tubuh dapat menerima sejumlah tertentu dosis radiasi. Indikator biologik akibat pajanan radiasi pada tubuh meliputi kerusakan yang terjadi pada sistem hematopoetik, sel germinal atau sel dalam sistem imunitas, cairan tubuh, komponen biologik membran sel dan karakteristik genetik atau sitologik. Di samping itu terdapat gejala lain seperti epilasi, edema, eritema, dan absces. Perubahan sitogenetik merupakan indikator yang dapat diandalkan yang dapat dikaji menggunakan sel limfosit darah tepi. Penghitungan aberasi kromosom pada sel limfosit merupakan suatu metode yang sangat sensitif untuk digunakan sebagai dosimeter biologi. Aberasi kromosom yang diinduksi oleh radiasi pengion pada sel limfosit dibagi dalam dua kelompok utama, yaitu aberasi tidak stabil (kromosom disentrik, fragmen asentrik dan kromosom cincin sentrik), dan aberasi stabil (translokasi dan inversi). Kromosom disentrik diyakini sebagai indikator kerusakan yang paling dapat diandalkan di antara aberasi tidak stabil dan digunakan sebagai dosimeter biologi pada individu yang terpajan secara akut dalam kasus kecelakaan radiasi yang pemeriksaannya harus dilakukan sesegera mungkin [2].

Dalam studi aberasi kromosom, efek radiasi pengion dapat diamati kemunculannya jika dilakukan pengkulturan sel pada metafase

pertama setelah pajanan radiasi. Metafase ini adalah waktu dimana struktur kromosom dapat dilihat paling jelas. Studi kerusakan akibat radiasi pada kromosom sel mamalia juga terhambat oleh keperluan akan pengamatan terhadap sejumlah besar kromosom untuk setiap sel dan ukurannya pun sangat kecil. Ketika sel tubuh terkena radiasi sinar-X misalnya, bergantung pada dosis radiasi, dapat menyebabkan patahan kromosom. Ujung patahan tersebut bersifat "lengket" dan dapat bergabung dengan ujung lain. Akan tetapi ujung ini tidak dapat bergabung dengan ujung kromosom yang normal atau tidak patah. Sekali patahan terbentuk, beberapa macam fragmen dapat melakukan beberapa cara perbaikan antara lain sebagai berikut [2] :

1. Patahan bergabung kembali sesuai dengan bentuk konfigurasi semula yang tentunya tidak akan ada kesalahan pada mitosis berikutnya
2. Patahan gagal melakukan penggabungan dan menyebabkan aberasi yang akan dihitung sebagai delesi pada mitosis berikutnya
3. Ujung patahan melakukan kombinasi dan bergabung dengan ujung patahan lain menghasilkan kromosom yang ukurannya lebih pendek ketika dilihat pada mitosis berikut.

Aberasi yang terjadi pada metafase dapat dibagi ke dalam dua kelompok yakni aberasi kromosom dan aberasi kromatid. Aberasi kromosom terjadi jika radiasi terhadap sel darah dilakukan pada awal interfase sebelum bahan kromosom melakukan duplikasi. Patahan akibat radiasi akan berada pada suatu untai tunggal kromatin, dan selama fase sintesis DNA berikutnya untai kromatin ini akan mengarahkan untai identik disampingnya dan melakukan replikasi patahan. Ini akan menuju ke pembentukan aberasi kromosom yang terlihat pada mitosis berikutnya karena akan ada patahan identik pada titik-titik yang sesuai dengan pasangan untai kromatin. Sebaliknya, jika radiasi diberikan setelah interfase yakni setelah materi DNA melipat dua dan kromosom terdiri dari dua

untai kromatin, maka aberasi yang terjadi adalah aberasi kromatid [3]. Bentuk aberasi kedua ini tidak akan dibahas lebih lanjut dalam tulisan ini, namun diulas secara meluas mengenai aberasi kromosom disentrik, translokasi, mikronuklei, teknik *flourescence in situ hybridization* (FISH) dan pemanfaatannya serta hasil penelitian untuk mendeteksi translokasi akibat radiasi dengan FISH.

KROMOSOM DISENTRIK DAN MIKRONUKLEI

Frekuensi aberasi kromosom yang terdeteksi dalam limfosit darah perifer telah digunakan untuk menentukan besarnya dosis pajanan radiasi pengion, baik karena bekerja dengan sumber radiasi atau kecelakaan. Beberapa peneliti juga menyatakan bahwa para pengguna telepon genggam [4] maupun astronot setelah kembali dari ruang angkasa [5] memiliki risiko perubahan kromosom dalam darahnya. Di samping itu, teknik yang handal ini digunakan juga untuk menentukan besarnya dosis yang diterima oleh korban bom atom Hiroshima dan Nagasaki setelah 30 tahun oleh para peneliti di Jepang.

Dalam kasus pajanan radiasi akut yang masih baru terjadi, metode yang paling sesuai adalah menghitung kromosom disentrik dalam metafase yang dipulas, kemudian mengekstrapolasikannya ke kurva dosis-efek acuan (standard) [6]. Namun, penggunaan kromosom disentrik sebagai dosimeter biologi sangat terbatas oleh waktu karena frekuensi atau jumlah sel yang mengandung kromosom ini akan terus menurun bersamaan dengan bertambahnya waktu pasca pajanan radiasi akibat dari proses seleksi terhadap aberasi tidak stabil yang terjadi selama proliferasi sel. Dengan demikian penggunaan kromosom disentrik pada individu yang terpajan radiasi secara kronik, seperti pekerja radiasi, atau individu yang terpajan beberapa bulan atau tahun yang lalu, menjadi suatu masalah karena tidak akan memberikan hasil yang akurat [7,8].

Penghitungan aberasi kromosom asimetris seperti disentrik dalam limfosit darah perifer merupakan pendekatan biologik yang sensitif untuk perkiraan besarnya pajanan radiasi pengion yang baru diterima oleh seseorang. Akan tetapi terdapat fenomena yang telah diketahui dengan baik bahwa seleksi terhadap jenis aberasi disentrik terjadi selama pembelahan sel yang disebabkan karena *anaphase bridging*. Oleh karena itu sel yang membawa disentrik disebut tidak stabil. Akibatnya insidensi disentrik akan di bawah perkiraan (*underestimate*) dalam analisis kuantitatif yang tidak menggunakan seluruh sel pada pembelahan pertama [3].

Perhitungan respon/tanggapan radiasi yang dapat dimanifestasikan dalam bentuk kromosom disentrik dengan teknik yang sederhana dan informatif akan sangat berguna dalam mempelajari risiko genetika setelah terpajan akibat kerja, terapi, atau kecelakaan radiasi yang dapat digunakan untuk menduga tingginya risiko seseorang untuk terjangkit kanker. Dosimetri biologi memiliki sejumlah aplikatif dan salah satu yang paling berguna adalah penentuan dosis akibat kecelakaan radiasi yang seringkali tanpa disertai dosimetri fisik. Kadangkala dosimetri fisik pun harus dilengkapi dengan dosimetri biologik, contohnya ketika terjadi pajanan radiasi pada tubuh seseorang saat kecelakaan radiasi, ketidaksengajaan seseorang menempatkan dosimeter fisiknya di dekat sumber atau kesengajaan untuk mengklaim jaminan kesehatan. Satu metode biologik untuk maksud dosimetri adalah analisa sitogenetik yakni aberasi kromosom dalam sel darah limfosit yang termasuk metode yang sensitif untuk perkiraan dosis, akan tetapi memerlukan waktu dan prosedur yang cukup lama [9].

Teknik sitogenetik sederhana sebagai alternatif lain dalam mempelajari kelainan kromosom adalah penghitungan frekuensi mikronuklei dalam kultur sel limfosit manusia. Teknik ini relatif lebih sederhana dan memungkinkan penghitungan yang cepat terhadap sejumlah besar sel dan dapat dilakukan oleh seseorang yang tidak harus trampil atau

memiliki pelatihan untuk analisis kromosom. Akan tetapi karena mikronuklei berasal dari fragmen asentrik atau seluruh kromosom, maka parameter ini dapat memberikan ukuran patahan dan kehilangan kromosom yang mana spektrum kerusakannya dapat berbeda dari analisis kromosom. Karakteristik hubungan dosis-respon yang diperoleh dengan metode patahan kromosom untuk limfosit manusia yang diberi pajanan secara *in vitro* terhadap radiasi pengion telah banyak dievaluasi oleh para peneliti [3].

Mikronuklei telah banyak digunakan sebagai indikator kerusakan radiasi dan merupakan indeks kuantitatif kerusakan kromosom dalam rangka mengkaji patahan dan kehilangan seluruh kromosom (*whole chromosome*). Efektivitasnya dipengaruhi oleh beberapa faktor antara lain waktu penundaan pembelahan sel akibat radiasi, fraksi sel yang membelah hanya sekali sejak pajanan radiasi, dan pengamatan sel yang akan menghasilkan aberasi baik kerusakan kromosom maupun kromatid. Hubungan antara mikronuklei dalam sel dengan sinar X, gamma atau beta diketahui bersifat linier hingga dosis 2 Gy, berbeda dengan hubungan yang linier kuadrat pada aberasi jenis-kromosom [10]. Dan satu hal paling penting adalah bahwa dosimeter biologik yang ideal harus dapat dilakukan dengan prosedur yang cepat, mudah dan aplikatif untuk semua jenis radiasi dan kualitasnya baik. Mikronuklei memiliki potensi untuk maksud ini dan melengkapi analisis metafase.

ABERASI KROMOSOM TRANSLOKASI

Seperti disebutkan di atas, dosimeter biologi yang didasarkan pada pengamatan aberasi disentrik memiliki keterbatasan yang dapat diatasi dengan pengamatan kromosom translokasi yang merupakan aberasi kromosom bersifat stabil karena sel yang mengandung kromosom bentuk ini tidak mati saat pembelahan sel. Dengan demikian frekuensi kromosom translokasi sangat berguna sebagai indikator kerusakan genetik yang tetap ada meskipun dalam waktu yang lama

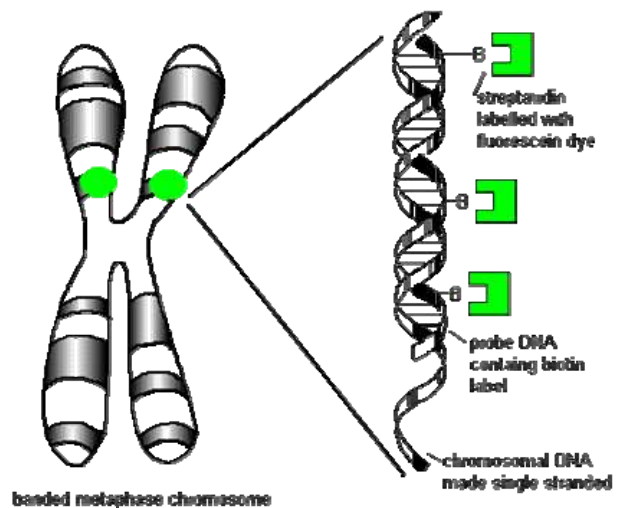
setelah pajanan radiasi atau sebagai indikator terjadinya akumulasi kerusakan akibat radiasi. Analisis frekuensi translokasi lebih cocok untuk pemeriksaan pajanan radiasi akut atau kronik yang dapat dilakukan beberapa tahun kemudian setelah terpajan radiasi.

Translokasi terjadi apabila patahan dua benang kromosom akibat radiasi bergabung kembali dengan cara baru. Patahan yang satu berpindah atau bertukar pada kromosom lain sehingga terbentuk kromosom baru yang berbeda dengan aslinya. Translokasi dapat terjadi baik di dalam satu kromosom (*intra-chromosome*) maupun antar kromosom (*inter-chromosome*). Pada tanaman, translokasi seringkali menyebabkan ketidak seimbangan gamet sehingga dapat menyebabkan kemandulan karena terbentuknya kromatid dengan duplikasi dan penghapusan. Akibatnya pemasangan dan pemisahan gamet menjadi tidak teratur sehingga menyebabkan terbentuknya tanaman aneuploidi. Translokasi juga menyebabkan beberapa tanaman mengalami mutasi sehingga menghasilkan mutan tanaman yang tahan terhadap suatu penyakit.

Translokasi pada manusia berperan dalam perkembangan kelainan atau penyakit genetik dan proses aktivasi onkogen yang menyebabkan sel normal berkembang menjadi sel ganas. Dengan demikian pendeteksian translokasi juga akan menjadi sangat penting baik untuk keperluan diagnostik maupun terapi [8]. Namun analisis terhadap aberasi kromosom stabil sangat sulit bila menggunakan tehnik pewarnaan (*banding*) konvensional seperti yang digunakan untuk pengamatan kromosom tidak stabil. Oleh karena itu telah dikembangkan suatu teknik yang lebih praktis untuk memvisualisasi terjadinya translokasi atau inversi pada kromosom yang dikenal sebagai FISH atau teknik pengecatan spesifik pada kromosom menggunakan *whole-chromosome probe* (pelacak) yang dilabel dengan suatu pewarna seperti biotin atau kombinasi beberapa pewarna pada kromosom yang diamati [11].

PEMANFAATAN TEKNIK FISH

Teknik FISH dikembangkan oleh Dr. R. Amann di Jerman sebagai metode yang digunakan untuk mendeteksi aberasi kromosom. Ini adalah teknik sitogenetik molekuler yang saat ini digunakan secara luas untuk *gene mapping*, diagnosis penyakit keturunan dan deteksi perubahan jumlah kopi gen dalam sel malignan. Teknik ini digunakan dalam hal dimana analisis sitogenetik konvensional tidak memungkinkan untuk mendeteksi atau meyakinkan ketidak normalan kromosom (Gambar 1). Teknik FISH secara luas digunakan untuk studi kromosom dan mutasi atau delesi gen serta banyak digunakan dalam praktek di seluruh bidang onkologi dan ilmu kedokteran lain seperti deteksi kekebalan bakteri terhadap obat. Secara garis besar, teknik FISH digunakan dalam *prenatal screening*, onkologi, diagnosa klinis dan pertanian.



Gambar 1. Prinsip dasar teknik FISH yang menunjukkan proses hibridisasi antara kromosom yang diamati dengan *whole chromosome probe* berlabel biotin.

Selain digunakan untuk mengetahui besarnya dosis radiasi yang diterima seseorang, teknik FISH juga digunakan di berbagai bidang lain. Beberapa contoh penggunaan teknik FISH adalah sebagai berikut.

1. Skrining Prenatal/pre-implantasi

Teknik FISH dapat digunakan untuk menentukan jumlah kromosom misalnya nomor 4, 13, 18, 21 yang spesifik untuk penyakit tertentu. Uji ini seringkali dilakukan pada sampel villi korion (*chorionic villi*), atau langsung pada sel janin/embrio. Untuk orang tua yang membawa suatu gen yang menyandi penyakit keturunan yang parah, maka sebaiknya dilakukan pembuahan secara *in-vitro* dan kemudian implantasi selektif embrio yang sehat. Studi di Swedia [12] mengulas aplikasi teknik FISH untuk mendeteksi delesi gen *dystrophin*. Ketidaknormalan ini dapat mengarah ke kondisi herediter parah yang disebut *Duchenne muscular dystrophy*.

2. Onkologi

a. Keganasan kanker ditentukan oleh *rearrangement* kromosom yang spesifik dan delesi gen. Teknik FISH sangat bermanfaat dalam uji onkologi karena dapat digunakan untuk memprediksi sifat sel tumor. Dalam onkologi, untuk mempertinggi sensitivitas, FISH digunakan bersama-sama dengan teknik immunohistokimia fluoresensi. Kombinasi ini digunakan untuk menguji sifat kanker ginjal, pankreas dan kelenjar ludah serta payudara. FISH merupakan teknik yang sensitif untuk studi perubahan kromosom dalam tumor sel germinal. Di samping itu, FISH sering digunakan untuk skrining penduduk berisiko tinggi untuk terjangkit kanker. Untuk kanker payudara, studi FISH digunakan untuk mengidentifikasi polisomi dan monosomi pada kromosom nomor 1, 8, 11, 17, dimana polisomi pada kromosom tersebut seringkali berhubungan dengan progresif keganasan [13].

b. Teknik FISH semakin luas digunakan dalam onkologi. Teknik ini dapat membantu menentukan stadium/fase tumor, prognosis progresif suatu penyakit dan menentukan keputusan klinis. Sebuah studi menunjukan bahwa perubahan genetik pada kanker

kandung kemih dapat diketahui dengan bantuan FISH yang lebih sensitif daripada teknik sitologi (biopsi) dalam menentukan stadium kanker [14].

- c. FISH juga dapat digunakan untuk uji ketidaknormalan genetik pada leukemia, terutama *chronic lymphocytic leukemia* yang ditandai oleh mikrodelesi pada kromosom 13 [15].
- d. Studi terbaru membuktikan penggunaan teknik FISH potensial untuk analisis lokus kromosom untuk mendeteksi panjang dan jumlah kromosom pada leukemia myeloid. Studi ini mampu mengidentifikasi mekanisme baru hilangnya gen penekan tumor dalam sel leukemia myeloid yang muncul dari neurofibromatosis [16].
- e. Deteksi ketidaknormalan genetik yang membuat rendahnya respon sel terhadap kemoterapi dapat membantu dalam memodifikasi pengobatan. Contohnya beberapa kasus glioma yang kebal terhadap terapi *tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand* (TRAIL). Analisis TRAIL pada kultur sel tunggal (*cell lines*) yang kebal terhadap obat menggunakan FISH mampu mendeteksi hilangnya segmen kromosom yang mengandung banyak gen, terutama gen *capsase-8*. Para peneliti menyarankan perlunya skrining semua pasien glioma untuk mendeteksi kelainan genetik yang menunjukkan tanggapannya terhadap pengobatan [17].
- f. Penemuan studi FISH dalam onkologi bermanfaat untuk mengembangkan terapi baru. Sebagai contoh kondrosarkoma adalah kanker dengan jumlah kasus terbanyak kedua pada tulang yang sangat agresif dan refraktif terhadap kemoterapi konvensional. Studi dari *City of Hope Medical Center* di California Amerika Serikat menemukan bahwa paling tidak 50% kasus kondrosarkoma memiliki delesi pada gen *methylthioadenoside phosphorylase* (MTAP). MTAP adalah enzim yang ditemukan di banyak tempat, dan esensial untuk sintesis metionin [18].

- g. Teknik FISH bersama-sama dengan teknik lain seperti analisis imunohistokimia berguna untuk mendeteksi sisa sel kanker setelah pengobatan. Sebagai contoh dalam studi setelah pengobatan menggunakan sampel sumsum tulang untuk mendeteksi sisa sel myeloma, diketahui bahwa teknik FISH ini mampu mendeteksi sisa sel myeloma pada 50% pasien [19].

3. Diagnosis penyakit di laboratorium klinis

Analisis FISH berguna untuk mendeteksi secara cepat infeksi bakteri serius seperti Brucellosis [20]. FISH merupakan alat diagnosa cepat, tidak seperti kultur darah yang memerlukan waktu paling tidak 24 jam untuk dapat tumbuh. Infeksi bakteri yang lain seperti *H pylori* dapat dideteksi dengan cara ini sehingga membantu memulai pengobatan yang diperlukan. Teknik FISH tidak hanya dipergunakan untuk mendeteksi kromosom translokasi, tetapi juga digunakan dalam bidang mikrobiologi yakni mendeteksi bakteri *Helicobacter pylori* penyebab gastritis, sekaligus kekebalannya terhadap obat. Hal ini telah dilakukan dengan sukses oleh Russmann H. dkk [21] di Universitas Munich Jerman tahun 2003 lalu dengan menggunakan preparat histologi. Dalam bidang ini diketahui bahwa kelebihan utama dari teknik FISH adalah ternyata pelacak oligonukleotida yang dilabel fluoresen dengan sasaran DNA atau rRNA dapat digunakan untuk menentukan secara akurat kerentanan (*susceptibility*) makrolida sehingga memungkinkan para ahli klinis menggunakan informasi penting dalam memberikan rekomendasi pengobatan yang tepat.

4. Pencemaran lingkungan

Ulsh, B.A dkk [22] di *Colorado State University* USA juga menguji kemungkinan pemanfaatan teknik FISH untuk mendeteksi dosis yang diterima oleh mikroorganisme *T. Scripta* di lingkungan yang tercemar radioisotop. Teknik ini juga berpotensi untuk studi biodosimetri lingkungan yakni pengkajian risiko ekologi dan program biomonitoring.

5. Pertanian

Teknik FISH digunakan untuk skrining kolonisasi bakteri pada tumbuhan untuk membedakan antara bakteri yang bermanfaat dan bakteri bersifat patogen serta mempertahankan kelangsungan pertanian. Studi di Australia [23] mengulas penggunaan teknik FISH untuk mendeteksi bakteri yang bermanfaat dalam tanah untuk pengkulturan gandum. Studi lain di Rusia mengulas penggunaan FISH untuk analisis genom dan mendeteksi panjang masing-masing gen dalam tanaman dari famili Brassica [24]. Informasi dari analisis genom tanaman dengan FISH berguna untuk proses pengkulturan benih tanaman baru dan modifikasi genetik berbagai macam benih tanaman.

FISH adalah teknik genetika molekuler yang cepat dan sensitif yang digunakan dalam berbagai bidang, tetapi teknik ini memiliki keterbatasan dengan kenyataan bahwa teknik ini cukup panjang (*labor-intensive*) dan mahal. Sehingga tujuan teknologi baru saat ini adalah mengembangkan teknik analisis yang lebih handal dan digunakan secara rutin yang hemat biaya (*cost-effective*) serta memberikan resolusi yang lebih tinggi daripada FISH. Ada kemungkinan teknik ini akan menggantikan FISH sepenuhnya dalam beberapa tahun mendatang. Namun saat ini FISH tetap menjadi pilihan untuk studi kelainan gen dan kromosom dalam dunia kedokteran.

PROSEDUR TEKNIK FISH

Untuk pemeriksaan translokasi dengan teknik FISH, diperlukan 5 ml darah dari korban kecelakaan radiasi atau donor sehat dan kemudian dimasukkan ke dalam tabung sentrifus steril yang mengandung heparin. Untuk donor sehat, sampel darah selanjutnya diiradiasi sinar gamma dengan variasi dosis dari pesawat iradiator gamma atau neutron pada laju dosis tertentu. Darah korban atau yang telah diiradiasi selanjutnya dimasukkan ke dalam media biakan RPMI-1640 yang diperkaya dengan *Fetal Bovine Serum* dan

stimulan pembelahan sel *phytohemagglutinin* (PHA) dan antibiotik serta disimpan dalam inkubator 37°C selama 72 jam. Tiga jam sebelum panen, ke dalam kultur ditambah dengan cholchisin untuk menghentikan pembelahan sel. Selanjutnya biakan darah dipanen dengan larutan fiksatif Carnoy (metanol : asam asetat = 3 : 1). Endapan kromosom diteteskan di atas *slide* sebanyak 2 tetes dan dikeringkan di atas hot plate 65°C selama 1½ jam.

Secara umum, proses FISH diawali dengan dehidrasi *slide* yang telah ditetesi larutan kromosom metafase ke dalam larutan serial etanol 70%, 90 % dan 100 % selama waktu tertentu. Selanjutnya *slide* dikeringkan (*aged*) di atas hot-plate suhu 65°C selama 1,5 jam. Di lain pihak *whole chromosome probe* sebanyak 1 µl dalam *buffernya* divortex dan disentrifuse kemudian didenaturasi pada suhu 65°C dan disimpan dalam waterbath suhu 37°C selama 45 menit (30-60 menit). *Slide* berisi kromosom didenaturasi dengan menginkubasinya dalam larutan formamida dalam *water-bath* suhu 65°C selama 1,5 menit dan dicuci berturut-turut dengan serial alkohol 70% dingin, 90% dua kali dan 100 % selama 5 menit.

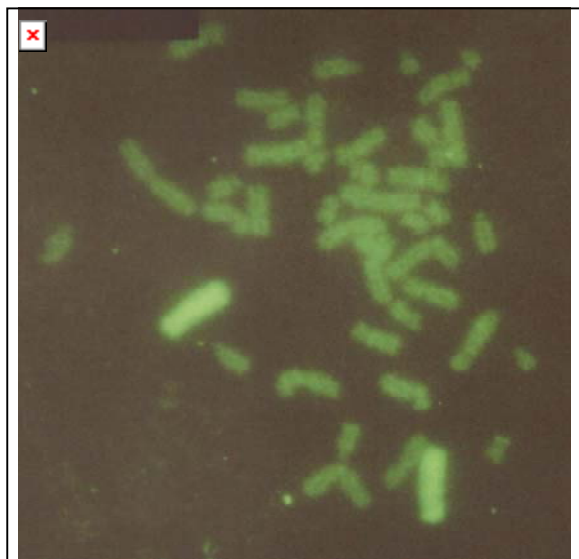
Proses hibridisasi dilakukan dengan meneteskan *probe* pada *slide* yang telah didenaturasi kemudian ditutup dengan *coverslip* serta bagian pinggir diolesi lem kuning untuk mencegah udara masuk (penguapan). *Slide* diletakkan dalam *lunch box* berwarna gelap dan diinkubasi pada suhu 37 °C selama 16 jam. Setelah proses hibridisasi, *coverslip* dibuka dan *slide* direndam dalam *waterbath* suhu 45°C selama 30 menit. Selanjutnya direndam berturut-turut dalam kopleng jar berisi *stringency wash solution* dua kali, larutan 1x SSC dua kali dan akhirnya larutan detergen selama 4 menit. Setelah dikeringkan, *slide* ditetesi dengan DAPI dan pengamatan translokasi dilakukan di bawah mikroskop epi-fluorescence. Prosedur teknik FISH dapat berbeda-beda tergantung dari produsen *probe* kromosom yang digunakan.

DETEKSI TRANSLOKASI AKIBAT RADIASI

Telah diketahui bahwa radiasi pengion dapat menyebabkan perubahan molekuler untai DNA dan nukleotida yang dimanifestasikan dalam bentuk kromosom translokasi. Kerusakan atau perubahan molekuler tersebut dapat diperbaiki oleh fungsi seluler yakni melalui mekanisme sistem pertahanan seluruh tubuh yang disebut sistem immuno-supresi. Namun apabila kerusakan tersebut tidak diperbaiki atau diperbaiki tidak dengan sempurna maka akan terbentuk kelainan kromosom yang bertindak sebagai pemicu kode genetik abnormal berupa mutasi yang dapat mengarah ke pembentukan kanker [25,26]. Mekanisme dimana radiasi bersifat karsinogenik meliputi induksi mutasi (perubahan struktur suatu gen atau kromosom), perubahan ekspresi gen tanpa adanya mutasi, dan virus onkogenik yang dapat menyebabkan neoplasia. Namun demikian masih diperkirakan adanya mekanisme lain [27].

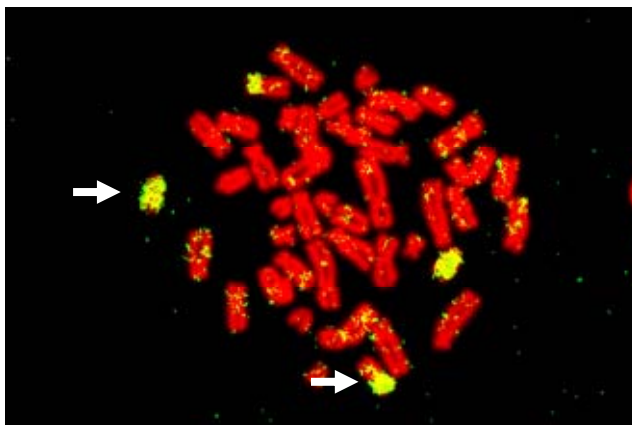
Identifikasi aberasi kromosom dengan teknik FISH memiliki tujuan utama untuk menetapkan hubungan antara frekuensi aberasi kromosom stabil dalam limfosit darah perifer dengan dosis pajanan radiasi kumulatif pada seseorang. Sejumlah laboratorium di luar dan dalam negeri telah menggunakan teknik ini dan telah ditetapkan beberapa hal penting seperti nomor kromosom yang dicat, jenis aberasi yang digunakan untuk pendugaan dosis, keberadaan translokasi terhadap waktu, jenis latar belakang (*background*) aberasi stabil sebagai pembanding dan juga kehandalan teknik FISH untuk dosimetri biologi.

Hasil pengecatan atau pemulasan (*painting*) kromosom dengan teknik FISH mengikuti prosedur sesuai petunjuk pembuat *probe* yang dilakukan oleh para peneliti PTKMR BATAN disajikan dalam Gambar 2, dimana terlihat bahwa dua buah kromosom nomor 1 dari sampel darah kontrol (0 Gy) yang dicat dengan *chromosome probe* berlabel biotin. Sejauh kemampuan para



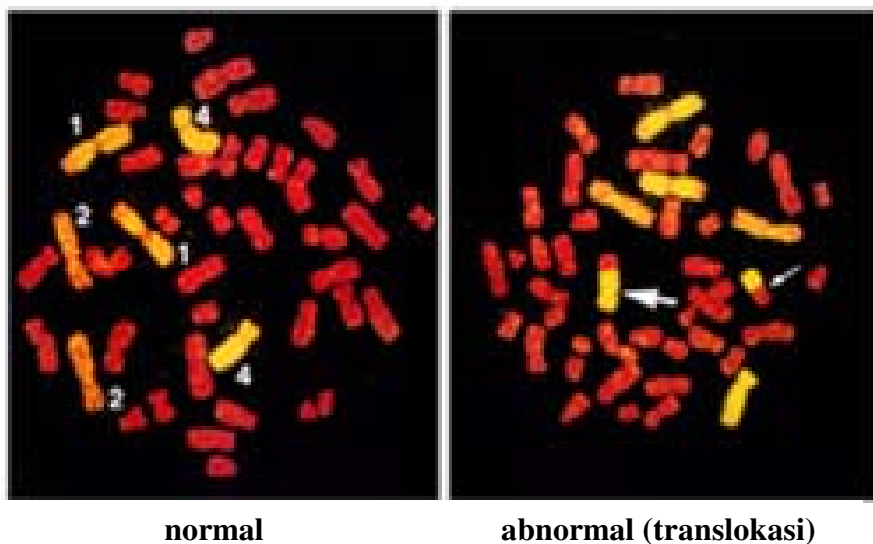
Gambar 2. Hasil pengecatan kromosom manusia nomor 1 dari dengan teknik FISH terhadap darah yang tidak diiradiasi (warna lebih terang daripada kromosom lainnya) hasil penelitian di PTKMR.

peneliti yang berkecimpung dalam pengembangan teknik FISH, tidak terlihat adanya translokasi dalam Gambar tersebut. Sedangkan hasil pengecatan kromosom dengan translokasi disajikan dalam Gambar 3 dan 4.



Gambar 3. Contoh hasil pengecatan kromosom yang mengandung translokasi dengan warna kombinasi kuning dan merah (tanda panah).

FISH yang juga dikenal sebagai *chromosome painting* merupakan suatu teknik pengujian yang dapat digunakan untuk analisis sitogenetik rutin baik untuk deteksi perubahan struktur maupun jumlah kromosom secara individual. Pengujian ini juga dapat digunakan dalam menentukan tingkat radiosensitivitas sel normal atau sel kanker secara *in vitro* yang hasilnya akan berperan penting dalam optimasi dosis radiasi pada radioterapi di tingkat individual.



Gambar 4. Contoh hasil penelitian lain yang menunjukkan kromosom normal nomor 1,2 dan 4 (kiri) dan kromosom mengandung translokasi (tanda panah, kanan).

Dengan demikian FISH sangat bermanfaat untuk kuantifikasi kerusakan sitogenetik akibat radiasi dalam mengkaji efek radiasi segera dan tertunda, maupun efek radiasi akibat pajanan radiasi kronik. Pada saat ini, masih sedikit laboratarium biologi yang memberikan layanan analisis sitogenetik kromosom, satu diantaranya Lembaga Eijkman yang melayani uji kromosom trisomi. Oleh karena itu pendayagunaan hasil pengembangan teknik FISH di BATAN akan digunakan untuk memberikan jaya layanan terhadap semua pekerja radiasi baik di lingkungan BATAN, Rumah Sakit, klinik, industri maupun sektor pengguna radiasi lainnya.

Sejumlah laboratorium di luar negeri telah menggunakan teknik FISH untuk pemantauan rutin dosis yang diterima oleh para pekerja radiasi. Bothwell et. al [28] telah menganalisis frekuensi translokasi dan disentrik pada kromosom nomor 1, 3 dan 4 dari darah yang diiradiasi sinar-X sampai 2 Gy. Hasil dari penelitian ini digunakan dalam analisis aberasi kromosom spontan dan akibat radiasi untuk menetapkan teknik biodosimetri yakni menentukan hubungan antara variasi masing-masing pekerja radiasi berusia 51-82 tahun dengan faktor-faktor kebiasaan hidup sehari-hari. Frekuensi translokasi teramati sebesar $14,33 \pm 0,87 \times 10^{-3}$ per genome ekuivalen. Untuk dosis 1,961 Gy, jumlah disentrik yang dianalisis dengan pewarna Giemsa adalah 184 dari 500 sel, sedangkan dengan teknik FISH menemukan 105 disentrik dan 98 translokasi dari 701 sel yang dihitung. Sentromer pun belum dapat diwarnai dengan teknik FISH dan perlu juga dicat agar lebih mudah dalam menentukan nomor kromosom menurut ukurannya dan intensitas pewarnaannya. Teknik menghitung (*scoring*) pun masih perlu dipelajari secara lebih mendalam dimana translokasi dibedakan ke dalam "komplet" dan "tidak komplet" serta translokasi "satu-langkah" (satu kali perpindahan antar kromosom) dan "dua-langkah". Beberapa peneliti juga menggunakan istilah translokasi "reciprocal" (saling memberi antar kromosom) dan "non reciprocal".

Seperti halnya dalam penentuan kurva dosis-respon untuk disentrik, dalam translokasi pun diharapkan adanya hubungan dengan rumus $Y = \alpha D + \beta D^2$ dimana Y adalah jumlah translokasi, D adalah dosis dan α dan β adalah koefisien yang menunjukkan hubungan dosis-respon. Pilihan jumlah warna kromosom (jumlah kromosom) yang dicat bergantung pada tinjauan teknik yang digunakan dan pada kemampuan peneliti yang bersangkutan dan peralatan meskipun pada umumnya hingga tiga kromosom yang besar untuk memaksimalkan proporsi perubahan total yang dapat diamati. Jika radiasi menginduksi patahan secara random pada DNA maka pembentukan aberasi akan proporsional dengan panjangnya. Bothwell dkk [28] menganalisis kromosom nomor 1, 3 dan 4 yang berkontribusi lebih dari 70% dari seluruh genom [29]. Sejumlah faktor sangat mempengaruhi hasil akhir teknik FISH. Proses denaturasi dengan pemanasan yang ditujukan untuk memisahkan dua untai DNA baik kromosom yang akan dicat maupun *probe* berlabel pewarna fluoresen harus benar-benar sempurna sehingga proses penggabungan (hibridisasi) keduanya dapat terjadi dan pengecatan kromosom dapat diamati di bawah mikroskop. Suhu dan lamanya denaturasi pun sangat menentukan terpisah tidaknya untai DNA. Teknik pemotretan pun harus dikuasai dengan baik karena hanya dengan pencahayaan yang cukup maka pemotretan dapat dilakukan.

Untuk penggunaan rutin dengan jumlah sampel yang besar, telah tersedia peralatan hybridizer untuk semi otomatis FISH dengan menghilangkan langkah-langkah prosedur yang *time-intensive*. Perkembangan FISH telah memungkinkan pengujian yang atraktif untuk berbagai keperluan yang luas termasuk untuk studi ekspresi suatu gen [30]. Analisis FISH dapat mengidentifikasi perubahan genetik dalam sel interfase dan mendeteksi translokasi terselubung pada kromosom metafase. Akan tetapi FISH bersifat informatif hanya untuk *probe* spesifik yang digunakan sedangkan analisis sitogenetik dapat mendeteksi sejumlah besar ketidaknormalan dan memberikan informasi diagnostik

dan prognostik pada pasien dengan berbagai macam keganasan. Sebagai contoh *probe* cosmid sangat berguna untuk mendeteksi *rearrangement* gen *bcr/abl* pada leukemia myeloid kronis atau *pml/rara* pada leukemia akut.

PENUTUP

Penggunaan teknik FISH pada metafase merupakan pendekatan yang relatif mudah dan sangat tepat untuk mengetahui perubahan kromosom spesifik khususnya translokasi dan dapat juga digunakan untuk mengkaji klon sel tumor dengan berbagai petanda sitogenetik. FISH juga memungkinkan untuk penghitungan yang cepat dan akurat induksi translokasi simetris atau aberasi stabil akibat radiasi pengion. Frekuensi translokasi tetap konstan sampai beberapa tahun pasca pajanan radiasi sehingga sangat bermanfaat untuk memperkirakan besar dosis yang diterima seseorang pada waktu lalu. FISH juga digunakan untuk menunjukkan terjadinya amplifikasi gen pada kultur sel tunggal karsinoma baik pada sel interfase maupun metafase. FISH menjadi teknik yang berguna dan dapat mengatasi keterbatasan teknik lain dan menjanjikan data yang akurat serta lebih unggul dibanding teknik lain seperti *Southern blot* atau imunohistokimia. Analisis FISH dapat digunakan untuk mengidentifikasi perubahan genetik terseleksi dalam sel interfase dan dapat mendeteksi translokasi tertutup pada kromosom metafase. Akan tetapi, FISH hanya bersifat informatif untuk *probe* spesifik yang digunakan, sedangkan analisis sitogenetik dapat mendeteksi ketidak normalan yang lebih luas dan memberikan informasi diagnostik dan prognostik pada pasien dengan berbagai macam keganasan.

DAFTAR PUSTAKA

1. MACHI, S., Nuclear technique serve mankind, Japan Atomic Industrial Forum (JAIF), Inc., 2002.
2. GRAY, J.W., LUCAS, J.N., PINKEL, D. and AWA, A., Structural Chromosome Analysis by Whole Chromosome Painting for Assessment of Radiation-Induced Genetic Damage, *J. Radiat. Res.* 33 Supplement: 80-86, 1992.
3. HALL, E.J., Radiobiology for the radiologist, Edisi keempat, Lippincott Williams&Wilkins, PA USA, 1994.
4. VIJAYALAKSMI, PICKARD, W.F., BHIST, K.S., LEAL, B.Z., MELTZ, M.L., ROTI ROTI, J.L., STRAUBE, W.L., and MOROS, E.G., Cytogenetic studies in human blood lymphocytes exposed in vitro to radiofrequency radiation at a cellular telephone frequency (835,62 MHz, FDMA), *Radiation Research* 155, 113-121, 2001.
5. DURANTE, M., SNIGIRYOVA, G., AKAEVA, E., BOGOMAZOVA, A., DRUZHININ, S., FEDORENKO, B., GRECO, O., NOVITSKAYA, N., RUBANOVICH, A., SHEVCHENKO, V., VON RECKLINGHAUSEN, U, and OBE, G., Chromosome aberration dosimetry in cosmonauts after single or multiple space flight, *Cytogenetic and Genome Research*, 103, 40-46, 2003.
6. FINNON, P., MOQUET, J.E., EDWARDS, A.A. and LLOYD, D.C., The Co-60 Gamma ray Dose-Response for Chromosomal Aberrations in Human Lymphocytes Analyzed by FISH; Applicability to Biological Dosimetry, *Int. J. Radiat. Biol.*, 75 (10), 1215-1222, 1999.
7. NAKANO, M., NAKASHIMA, E., PAWEL, D.J., KODAMA, Y. and AWA, A., Frequency of Reciprocal Translocations and Dicentrics Induced in Human Blood Lymphocytes by X-irradiation as Determined by Fluorescence In Situ Hybridization, *Int. J. Radiat. Biol.*, 64 (5), 565-569, 1993.
8. COCO-MARTIN, J.M., SMEET, M.F.M.A., POGGENSEE, M., MOOREN, E., HOFLAND, I., VAN DE BRUG, M., OTTENHEIM, C., BARTELINK, H. and BEGG, A.C., Use of Fluorescence In Situ Hybridization to Measure Chromosome Aberrations as A Predictor of Radiosensitivity in Human Tumour Cells. *Int. J. Radiat. Biol.*, 66 (3), 297-307, 1994.
9. KIM, S.H., CHO, C.K., KIM, T.H., YOO, S.Y., KOH, K.H., and YUN, H.G., Frequency of micronuclei in lymphocyte following gamma and fast-neutron irradiations, *Anticancer Research*, 13, 1587-1592, 1993.
10. PROSSER, J.S., MOQUET, J.E., LLOYD, D.C. and EDWARDS, A.A., Radiation induction of micronuclei in human lymphocytes, *Mutation Research* 199, 37-45, 1988.
11. RIED, T., SCHROCK, E., and WIENBERG, J., Chromosome painting : a useful art, *Hum. Mol. Genet.*, 7 (10), 1619-1626, 1998.

12. MALMGREN, H., WHITE, I., JOHANSON, S., LEVKOV, L., IWARSSON, E., FRIDSTROM, M., and BLENNOW, E., PGD for dystrophin gene deletions using fluorescent in situ hybridization, *Molecular Human Reproduction*, 2006 (published online on April 11, 2006).
13. SNEIGE, N., Correlation of cytologic findings and chromosomal instability detected by fluorescent in situ hybridization in breast fine-needle aspiration specimens from women at high risk for breast cancer, *Modern Pathology*, 19(5):622-629, 2006.
14. KRAUSE, F.S., Clinical decisions for treatment of different stages bladder cancer based on multi-target fluorescent in situ hybridization assays, *World Journal of Urology* 4, 2006; May 4.
15. STOCKERO, K.J., Metaphase cells with normal G-bands have cryptic deletions in 13q14 detectable by fluorescent in situ hybridization in B-cell chronic lymphocytic leukemia, *Cancer genetics and cytogenetics*, 166(2), 9156-9160, 2006.
16. STEPHEN, K., Interstitial uniparental idiosomy at clustered breakpoint intervals is a frequent mechanism of NF-1 inactivation in myeloid malignancies, *Blood*, 2006 (published online on May 11, 2006).
17. LI, Y.C., Genomic alterations in human malignant glioma cells associate with the cell resistance to the combination treatment with tumor necrosis factor related apoptosis inducing ligand and chemotherapy, *Clinical Cancer Research*, 12(9), 2716-2729, 2006.
18. CHOW, W.A., Methylthioadenosine phosphorylase gene deletions are frequently detected by FISH in conventional chondrosarcomas, *Cancer genetics and Cytogenetics*, 166(2), 95-100, 2006.
19. ZHAO, X., Comparison of ancillary studies in the detection of residual disease in plasma cell myeloma in bone marrow, *American Journal of Clinical Pathology*, 125(6), 895-904, 2006.
20. WELLINGHAUSEN, N., Rapid detection of Brucella spp. in blood cultures by FISH, *Journal of Clinical Microbiology*, 44(5), 1828-1830, 2006.
21. RUSSMANN, H., SCHMIDT, A.F., ADLER, K., AUST, D., FISCHER, A., and KOLETZKO, S., Detection of *Helicobacter pylori* in paraffin-embedded and in stock-frozen gastric biopsy samples by Fluorescent In Situ Hybridization, *Journal of Clinical Microbiology*, 41, 813-815, 2003.
22. ULSH, B.A., WHICKER, F.W., HINTON, T.G., CONGDON, J.D., and BEDFORD, J.S., Chromosome translocation in *T. scripta*: the dose-rate effect and *in vivo* lymphocyte radiation response, *Radiation Research* 155, 63-73, 2001.
23. WATT, M., Numbers and locations of native bacteria on field-grown wheat roots qualified by fluorescent in situ hybridization, *Environmental Microbiology*, 8(5), 871-84, 2006.
24. MALUSZYNSKA, J. and HASTEROK, R. Identification of individual chromosome and parental genomes in *Brassica juncea* using GISH and FISH, *Cytogenetic and Genome Research*, 109, 310-314, 2005.
25. FINLAY, C.A., HINDS, P.W. and LEVINE, A.J., The p53 proto-oncogene can act as a suppressor of transformation, *Cell*, 57, 1083-1093, 1989.
26. KONDO, S. Health effects of low-level radiation, Kinki University Press, Osaka, Japan and Medical Physics Publishing, Madison USA, 1993.
27. KULKA, U., HUBER, R., MULLER, P., KNEHR, S., and BAUCHINGER, M., Combined FISH painting and harlequin staining for cell cycle-controlled chromosome analysis in human lymphocytes, *Int. J. Radiat. Biol.*, 68, 25-27, 1995.
28. BOTHWELL, AM, WHITEHOUSE, CA and TAWN, EJ., The application of FISH for chromosome aberration analysis in relation to radiation exposure, *Radiation Protection Dosimetry*, 88, 7-14, 2000.
29. MORTON, N., Parameters of the human genome, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 88, 7474-7476, 1991.
30. RICHKIND, K., Dakocytomation automates in situ hybridization, *Carpinteria USA*, 2004.