

## GENOTOXICITY EFFECT OF CHLORHEXIDINE

Dita Septiani<sup>1</sup>, Elza Ibrahim Auerkari<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Departemen Oral Biologi, Fakultas Kedokteran Gigi, Universitas Indonesia  
Jalan Salemba Raya No. 4 (021) 31930270  
Email : eiauerkari@yahoo.com

### ABSTRACT

Chlorhexidine (CHX) is a mouthwash that is chosen by many dentists as an antiseptic and antibacterial. CHX has bactericidal properties in gram-positive and negative bacteria and fungi. Chlorhexidine causes damage to the permeability of bacterial cell membranes so that cytoplasmic fluid in bacterial cells and other cell components with lower molecular weight from inside the cell penetrates out through the cell membrane, causing the bacteria to die. Much research has been done to study the biocompatibility of composite resins, especially cytotoxicity and genotoxicity testing. Genotoxicity tests that are often done are comet tests to see DNA damage and micronuclei tests to see genome damage. CHX increases Fe-dependent lipid peroxidation by splitting oxygen bonds with iron ions in fentonlike reactions, producing alkoxy radicals. The ROS reaction of unsaturated lipids on cell membranes and plasma lipoproteins results in the formation of lipid peroxide (malondialdehyde) which can chemically alter proteins and bases nucleic acid. The content of chlorhexidine can have genotoxic effects.

**Keyword:** Genotoxic, chlorhexidine, comet assay, micronuclei assay

### PENDAHULUAN

*Chlorhexidine* (CHX) merupakan obat kumur yang paling banyak disarankan dokter gigi untuk digunakan karena memiliki efek antimikroba. CHX memiliki sifat bakterisida pada bakteri gram positif dan negatif dan jamur [1,2]. Banyak penelitian yang sudah dilakukan untuk mengetahui biokompatibilitas dari CHX, terutama uji sitotoksitas dan genotoksitas. Uji genotoksitas yang sering dilakukan adalah uji komet untuk mendeteksi kerusakan DNA dan uji micronuclei untuk mendeteksi kerusakan genom. Beberapa penelitian sebelumnya mengatakan bahwa CHX mempunyai efek tosisitas. Maka dari itu, dibutuhkan suatu kajian mengenai genotoksitas dari penggunaan Chlorhexidine untuk memberikan pengetahuan kepada dokter gigi dan

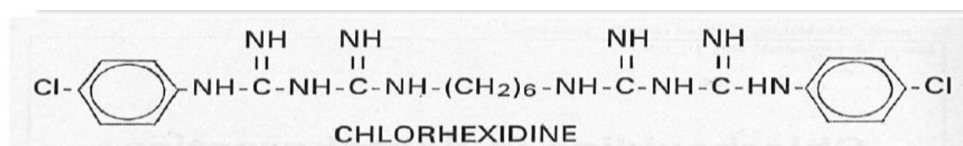
dapat mempertimbangkan pemakaian CHX sebagai alternatif terapi.

### Chlorhexidine

*Chlorhexidine* memiliki aktivitas substantif yang memiliki aplikasi yang luas mulai dari menjaga kebersihan mulut, pra operasi hingga pasca operasi. Saat ini klorheksidin secara rutin telah digunakan oleh dokter ketika mereka merawat pasien dengan kasus periodontal, ortodontia dan operasi maksilofasial. Mekanisme kerja dari CHX mempunyai sifat bakteriostatik dan bakterisidal untuk bakteri gram positif dan gram negatif, dipengaruhi oleh konsentrasi yang digunakan. Molekul CHX mempunyai muatan positif atau bersifat kation dan sebagian besar muatan molekul bakteri mempunyai muatan negatif atau bersifat anion. Hal ini mengakibatkan perlekatan yang

adekuat untuk chlorhexidine menempel pada membran sel bakteri. *Chlorhexidine* menyebabkan rusaknya permeabilitas membran sel bakteri sehingga cairan sitoplasma pada sel bakteri dan komponen sel

lain dengan berat molekul yang lebih rendah dari dalam sel menembus keluar melalui membran sel sehingga menyebabkan bakteri tersebut mati [1,2].



Gambar 1. Struktur Chlorhexidine

## METODE

Metode penulisan artikel menggunakan penelusuran literatur melalui database online yaitu PubMed, CINAHL, ScienceDirect, dan Proquest. Literatur dibatasi dari tahun 2004–2019 dengan kata kunci “genotoxicity”, “Chlorhexidine”, dan “genotoxin”. Sebanyak 13 artikel didapatkan pada kajian literatur ini.

## HASIL dan PEMBAHASAN

Genotoksisitas adalah kemampuan bahan kimia untuk merusak informasi genetik di dalam sel sehingga mengakibatkan mutasi. Substansi genotoksik menginduksi kerusakan materi genetik dalam sel melalui interaksi dengan sekuens dan struktur DNA. Semua bahan kimia mutagenik bersifat genotoksik; namun, tidak semua senyawa genotoksik bersifat mutagenik [3].

Efek genotoksik terdiri dari titik mutasi sepanjang untai DNA, kerusakan struktur keseluruhan DNA, atau kerusakan pada struktur kromosom (yang mengandung DNA). Berbagai tes telah dikembangkan untuk menentukan

apakah kerusakan telah terjadi pada salah satu dari ini tingkat. Tes yang paling sering dilakukan untuk mutagenesis adalah Ames tes, untuk mendeteksi titik mutasi dengan menggunakan beberapa untai DNA dari bakteri *Salmonella typhimurium*, yang telah dipilih untuk sensitif kepada mutagen. *Mouse Lymphoma* dan *HGPRT assay* merupakan prosedur yang biasa digunakan pada sel mamalia untuk mendeteksi titik mutasi. *Mouse Lymphoma assay* juga dapat untuk mendeteksi lesi clastogenik pada gen (kerusakan kromosom) [4,5]. Uji untuk kerusakan dan perbaikan DNA termasuk in vitro dan in vivo *Unscheduled DNA Synthesis (UDS)*. Uji sitogenetik dapat digunakan untuk mengobservasi langsung kerusakan kromosom. Terdapat metode in vivo dan in vitro termasuk uji Aberasi Kromosom dan *Mouse Micronucleus assays* [3].

ISO 10993-1 menetapkan penilaian potensi genotoksik untuk material yang permanen dan memiliki kontak lama (>24 jam) dengan jaringan internal dan darah.

Material pada extracorporeal dengan kontak terbatas (<24 jam) mungkin memerlukan evaluasi genotoksisitas. Umumnya, material dengan eksposur lama membutuhkan tes Ames dan dua metode in vivo, biasanya dengan Aberasi Kromosom dan *Mouse Micronucleus*. Material yang kontak tubuh dapat diuji hanya dengan menggunakan uji Ames [4,5].

Kerusakan DNA juga dapat dideteksi dengan menggunakan *Comet Assay* atau *Single Cell Gel Electrophoresis* (SCGE). Tes tersebut dapat digunakan untuk mengukur kerusakan DNA baik dalam bentuk *single strand break* (SSB) atau *double strand breaks* (DSB). Prinsip uji ini menggunakan besarnya fragmen DNA yang terdenaturasi bermigrasi keluar dari inti sel pada saat tahap elektroforesis. Elektroforesis merupakan metode pemisahan molekul dan komponen bermuatan berdasarkan perbedaan tingkat migrasinya pada media gel agarose. Metode ini dilakukan dengan menanamkan atau *embedding* sel pada lapisan tipis *low melting agarose* (LMA) di atas preparat mikroskop, setelah itu dilanjutkan pelilisan dengan larutan deterjen serta garam yang memiliki konsentrasi tinggi (*cold lysis solution* seperti NaCl, EDTA, Tris-HCl, triton X-100) [4,5].

Molekul DNA memiliki gugus fosfat yang mempunyai muatan listrik negatif pada larutan bersifat alkali, hal ini mengakibatkan daerah pada double strand DNA yang mengalami pengenduran dan mengandung DSB akan pindah menuju kutub positif (anoda) saat prosedur elektroforesis. Migrasi

tersebut akan terlihat sebagai ekor komet, sedangkan daerah yang tidak mengalami pengenduran akan terlihat sebagai kepala komet. Jadi dapat dikatakan DNA yang utuh terdapat pada kepala komet dan DNA yang rusak terdapat pada ekor. [4,5].

Dua metode tes komet yang dapat dilakukan yaitu metode netral dan metode alkali. Metode netral dilakukan menggunakan larutan pH 9,5 pada proses pelisisan sel dan elektroforesis. Nilai pH tersebut berada di bawah ambang batas nilai pH yang digunakan untuk membuka double strand DNA (*DNA unwinding*), sehingga kerusakan yang terjadi dapat terdeteksi hanya berupa DSB pada DNA. Metode alkali menggunakan larutan (1 mM EDTA dan 300 mM sodium hidroksida) yang memiliki nilai pH > 13 sehingga double strand DNA dapat terbuka dan SSN dapat terdeteksi. Secara umum metode *comet assay* dimulai dengan persiapan preparat, pelisisan sel, elektroforesis, netralisasi preparat, pewarnaan dan melihat hasil pada preparat [4-6].

Selain itu ada *micronucleus assay* yang mendeteksi kerusakan genom, karena *misrepair*, mengakibatkan perubahan yang parah pada struktur kromosom yang berakibat pada pembentukan fragmen acentrik atau tetap tidak diperbaiki dalam bentuk kromosom yang terpecah. Uji ini bahkan mendeteksi kerusakan pada spindle mitosis yang menghasilkan lagging kromosom selama anafase dan akhirnya hilang oleh proses mikronukleus. Kehadiran

micronuclei menunjukkan ketidakstabilan genom. Pecahnya double strand merupakan titik awal dalam fiksasi kerusakan DNA dalam bentuk penyimpangan kromosom. Pada fase selanjutnya dari pembelahan sel, terjadi beberapa jenis penyimpangan, seperti kromosom terpecah dan terbentuk fragmen acentrik, muncul sebagai mikronuklei [4,5].

Agar mikronukleus dapat dihitung, harus memenuhi kondisi berikut: (a) harus terdiri dari nuclear material; (B) itu harus benar-benar dipisahkan dari nukleus orang tua; (c) diameternya harus kurang dari sepertiga dari inti yang terkait; (D) halus, berbentuk oval atau bulat; (e) harus berada pada bidang fokus yang sama dan (f) harus memiliki warna, tekstur, dan refraksi yang sama dengan nukleus utama [6].

### **Efek Genotoksisitas Chlorhexidine**

CHX dilaporkan memiliki efek toksin apabila diberikan dengan konsentrasi yang tinggi dan jangka waktu yang lama [6]. Efek buruk CHX pada membran plasma terjadi oleh pengikatan elektrostatis yang tidak spesifik pada bagian negatif dari kedua komponen protein dan fosfolipid dari membran plasma, plasma rusak dan meningkatkan permeabilitas terhadap ion kalsium yang disertai dengan kebocoran enzim lisosom dari sel [7]. CHX meningkatkan peroksidasi lipid dependen Fe melalui pembelahan ikatan oksigen dengan ion besi dalam reaksi Fentonlike, menghasilkan radikal alkoksil [8]. Reaksi ROS pada lipid yang tidak jenuh pada membran sel dan plasma lipoprotein

mengakibatkan terbentuknya lipid peroksida (*malondialdehyde*) yang secara kimia dapat merubah protein dan basa asam nukleat. CHX terbukti menginduksi transisi permeabilitas mitokondria, *leakage* protein transmembran melalui spesies oksigen reaktif [9]. CHX dapat menyebabkan generasi Reactive Oxygen Species (ROS) dan dapat memainkan peran penting dalam kaskade transduksi sinyal yang mendasari toksisitas CHX [10]. ROS adalah agen utama yang bertanggung jawab atas kerusakan DNA endogen, dan produksi ROS telah terbukti mempengaruhi perkembangan siklus sel, apoptosis, dan toksisitas. ROS yang diinduksi CHX berkorelasi dengan sitotoksitas dan genotoksitasnya [11-13].

CHX penginduksi apoptosis ditemukan dalam sejumlah penelitian untuk dikaitkan dengan stres oksidatif melalui pembentukan Reactive Oxygen Species (ROS). Peningkatan ROS pada cel lines diikuti oleh penipisan glutathione intaseluler (GSH), agen pereduksi alami utama yang terlibat dalam detoksifikasi seluler dan pemeliharaan keseimbangan redoks. Para peneliti mendukung bahwa penipisan GSH disertai oleh peroksidasi lipid dan kerusakan mitokondria, yang ditunjukkan oleh kerusakan potensial membran mitokondria. Efek ini secara signifikan dikurangi oleh turunan larutan tocoferol (vitamin E) dan oleh CCCP (carbonylcyanide m-chlorophenylhydrazone), sebuah pelepasan fosforilasi oksidatif pada peroksidasi lipid dan kebocoran LDH [6,8,11].

## KESIMPULAN

CHX dapat menyebabkan efek genotoksik dalam sel, karena komponen reaktif oksidatifnya. Tubuh kita memiliki mekanisme pertahanan untuk mencegah DNA oksidatif. Tapi, terlalu banyak ROS akan terjadi kerusakan DNA dan mempengaruhi sel, jaringan dan organ. Pengetahuan dasar tentang efek genotoksik pada penggunaan CHX dapat membuat dokter gigi untuk lebih berhati-hati ketika memilih CHX dalam perawatannya dan mendorong penelitian yang lebih jauh untuk mendapatkan pilihan alternatif lain yang lebih aman.

## DAFTAR PUSTAKA

- [1] Lakhani, Vandana. Chlorhexidine An-Insight. International Journal of Advanced Research (2016), Volume 4, Issue 7, 1321-1328 DOI: 10.21474/IJAR01/958
- [2] Kumar. Chlorhexidine Mouthwash- A review. Journal of Pharmaceutical Science and Research (2017), Volume 9, Issue 9, 1450-1452 ISSN: 0975-1459
- [3] Arabaci, et all. Assessment of cytogenetic and cytotoxic effects of chlorhexidine digluconate on cultured human lymphocytes. Acta Odontologica Scandinavica (2013) 71: 1255–1260 DOI: 10.3109/00016357.2012.757646
- [4] Ramadhani, D; Purnami, S; Tetriana, D. Deteksi Kerusakan Dna Pada Sel Limfosit Darah Tepi Manusia Dengan Teknik Tes Komet. ISSN 1410-4652. Volume 15 Nomor 2, Desember 2013. Pusat Teknologi Keselamatan dan Metrologi Radiasi Badan Tenaga Nuklir Nasional
- [5] Gharsalli, T. 2016. Comet Assay on Toxicogenetics; Several Studies in Recent Years on Several Genotoxicological Agents. Journal of Environmental & Analytical Toxicology. Faculty of Pharmacy of Monastir, Tunisia. DOI: 10.4172/2161-0525.1000418
- [6] Septiwidyati, Genotoxin Effect of Composite Resin. Indonesian Journal of Legal and Forensic Sciences (IJLFS), [S.l.], v. 9, n. 1, p. 8-18 June 2019. ISSN 2657-0815.
- [7] Mousza, et all. Genotoxicity and cytotoxicity of chlorhexidine in rats. EJBMB (2006) 24:462-475
- [8] Khan, et all. Genotoxic assessment of chlorhexidine mouthwash on exfoliated buccal epithelial cells in chronic gingivitis patients. Journal of Indian Society of Periodontology (2016) 20:584-591 DOI: 10.4103/jisp.jisp\_9\_17
- [9] Banerjee, et all. Cytotoxic effect of chlorhexidine gluconate mouthwash – A micronuclei-assay. International Journal of Applied Dental Sciences (2017) 3(3): 82-85
- [10] Liu, et all. Cytotoxicity evaluation of chlorhexidine gluconate on human fibroblasts, myoblasts, and osteoblasts. J. Bone Joint Infect (2018) 3(4): 165-172. DOI 10.7150/jbji.26355
- [11] Ribeiro, et all. Chlorhexidine induces DNA damage in rat

- peripheral leukocytes and oral mucosal cells. *Journal of Periodontal Research* (2004) 39; 358–361. DOI 10.1111/j.1600-0765.2004.00759.x
- [12] Yudianto, Analisis Dna Mitokondria Swab Earphone Sebagai Bahan Alternatif Pemeriksaan Identifikasi. *Indonesian Journal of Legal and Forensic Sciences (IJLFS)*, [S.l.], v. 7, jan. 2018. ISSN 2657-0815.
- [13] Li, et all. Cytotoxicity and Genotoxicity of Chlorhexidine on Macrophages In Vitro. *Environmental Toxicology* (2012) 1-7 DOI 10.1002/tox.21771