

# Hubungan antara pigmentasi cepat dengan kemampuan pemulihan DNA oksidatif; kajian pada pelajar SD yang berolah raga di bawah terik matahari

Retno Mustikaningsih, Yohanes Widodo Wirohadidjojo, Sunardi Radiono  
Bagian/SMF Ilmu Kesehatan Kulit dan Kelamin  
Fakultas Kedokteran Universitas Gadjah Mada/RS Sardjito Yogyakarta

## ABSTRACT

Retno Mustikaningsih, Yohanes Widodo Wirohadidjojo, Sunardi Radiono - *Correlation between immediated pigmentation with oxydative DNA repair. A study among elementary school children under sun exposed sport activity*

**Background:** Oxydative DNA damage, namely 8-OHdG, may occurred due to DNA oxydation by reactive oxygen species (ROS). Unrepaired 8-OHdG may initiate a carcinogenesis due to G to T transversion of gene point mutations. The 8-OHdG repair can be measured by determination of urinary 8-OHdG level. It is well known that ROS reaction with preexisting melanin may perform an immediate pigmentation darkening (IPD) and it can be measured by mexameter. The correlation between IPD and 8-OHdG repair capacity is still not known.

**Aim of Study:** To know the correlation between IPD and 8-OHdG repair ability in order to predict the oxydative DNA repair capacity.

**Methods:** Using of a quasi experimental design, 8-OHdG urine level alteration correlated with skin color alteration after oxydative stress among 30 healthy elementary-school children during sport activity program under sun exposure. 24 hours of skin color alterations as a IPD were measured by mexameter, and urinary-8-OHdG- level were measured based on ELISA with 8-OHdG-Kit antibody. The correlation between IPD and 8-OHdG urine level alteration was analyzed with Spearman test.

**Results:** There was a very significant correlation between immediate pigmented darkening and urinary 8-OHdG level alteration ( $r=0.8562$ ;  $p<0.01$ ).

**Conclusion:** IPD represents 8-OHdG repair capacity after oxydative stressed under sun exposure

**Keyword:** immediate pigmentation darkening - 8-OHdG - mexameter - sun exposure

## ABSTRAK

Retno Mustikaningsih, Yohanes Widodo Wirohadidjojo, Sunardi Radiono - *Hubungan antara pigmentasi cepat dengan kemampuan pemulihan DNA oksidatif; kajian pada pelajar SD yang berolah raga di bawah terik matahari*

**Latar belakang:** Kerusakan DNA oksidatif berupa 8-OHdG terjadi akibat reaksi DNA dengan *reactive oxygen species* (ROS). Apabila kerusakan itu tidak dipulihkan, 8-OHdG dapat menjadi inisiator karsinogenesis akibat *gene point mutations* karena transversasi G ke T. Kerusakan dan pemulihan 8-OHdG dapat diukur dengan menentukan ekskresi 8-OHdG urin. Di sisi lain, reaksi ROS dengan melanin menyebabkan pigmentasi cepat yang dapat diukur dengan mexameter. Hubungan pigmentasi cepat dengan kemampuan pemulihan 8-OHdG belum diketahui.

**Tujuan:** Untuk mengetahui hubungan antara pigmentasi cepat dengan kemampuan pemulihan 8-OHdG.

**Metode:** Dengan rancangan penelitian eksperimental kuasi, perubahan kadar 8 OHdG urin dihubungkan dengan perubahan warna kulit 24 jam pasca stres oksidatif pada 30 pelajar SD yang berolah raga di bawah terik matahari. Perubahan warna kulit 24 jam pasca pajanan merupakan pigmentasi cepat/ *imme-*

*diate pigmented darkening* (IPD) diukur dengan meksameter, perubahan kadar 8-OHdG-urin diukur dengan uji ELISA menggunakan antibodi-Kit-8-OHdG. Hubungan antara IPD dan perubahan kadar 8-OHdG-urin diuji dengan uji koefisien korelasi Spearman.

**Hasil:** Dijumpai adanya hubungan yang sangat bermakna antara IPD dengan perubahan kadar 8-OHdG urin ( $r:0,8562$ ;  $p < 0,01$ )

**Simpulan:** IPD menggambarkan kemampuan pemulihan 8-OHdG akibat stres oksidatif di bawah terik matahari.

(B.I.Ked. Vol. 37, No.2 : 74-79, 2005)

## PENDAHULUAN

Pajanan sinar matahari (SM) pada sel hidup dapat menyebabkan berbagai reaksi fotokimiawi seperti fotoadisi, fotoisomerisasi, dan fotooksidasi. Reaksi fotooksidasi terjadi akibat pelepasan *reactive oxygen species* (ROS) berupa: anion superoksida ( $O_2^-$ ), hidrogen peroksida ( $H_2O_2$ ), dan radikal hidroksil (-OH) oleh kromofor yang menyerap sinar ultraviolet.<sup>1,2</sup> Berbagai penelitian menunjukkan bahwa guanin adalah target utama ROS pada basa DNA, berupa oksidasi pada gugus C8 basa guanin sehingga membentuk 8-hidroksi-deoksiganosin (8-OHdG).<sup>3,4</sup> Berdasarkan potensi mutagenik 8-OHdG, banyak ahli beranggapan bahwa senyawa ini merupakan biomarker kerusakan dan pemulihan DNA oksidatif.<sup>3,6,7</sup> Pada proses pemulihan DNA oksidatif, baik dengan enzim glikosilase maupun dengan eksinuklease, 8-OHdG akan dilepaskan dari rantai DNA dan diekskresikan melalui urin.<sup>5</sup> Kegagalan pemulihan 8-OHdG akan berakibat mutasi gen akibat transversi G ke T pada urutan DNA gen tersebut.<sup>6,7</sup> Dewasa ini tersedia berbagai cara untuk mengidentifikasi 8-OHdG urin, antara lain dengan menggunakan *high performance liquid chromatography* (HPLC), gas kromatografi, uji ELISA, dan lain lain.<sup>5,8,9</sup> Namun, cara-cara tersebut membutuhkan peralatan atau senyawa reagen yang mahal.

ROS yang terbentuk akibat pajanan SM maupun sebab lain dapat menyebabkan oksidasi melanin yang ada sehingga terbentuk melanin teroksidasi yang dikenal secara klinis sebagai *immediate pigmentation darkening* (IPD).<sup>10</sup> IPD sulit timbul pada ras Caucasoid dan tidak terbaca pada ras negroid yang warna kulitnya hampir tidak terpengaruh oleh pajanan sinar matahari (SM). Bagi rumpun Melayu yang bertipe kulit III-IV, pajanan SM akan meningkatkan pigmentasi kulit, baik IPD maupun *delayed pigmentation* (DP) yang terbentuk

akibat melanogenesis. Besar peningkatan pigmentasi sejajar dengan banyaknya SM yang diterima.<sup>11</sup> Berdasarkan perubahan indeks melanin IPD diukur dalam 30 menit sampai 3 hari, sedangkan DP diukur 5 sampai 7 hari pasca pajanan.<sup>12</sup>

Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui hubungan antara perubahan kadar 8-OHdG urin dan IPD setelah berolah raga di bawah terik matahari.

## METODOLOGI PENELITIAN

### Desain dan subyek penelitian

Penelitian ini dirancang menggunakan desain *experimental kuasi*. Subyek penelitian adalah pelajar SD Sendangadi Mlati, Sleman, Yogyakarta yang melakukan kegiatan olah raga di lapangan olah raga pada pukul 09.30-11.00 WIB, dan dilanjutkan pemeriksaan meksameter di RS. Dr Sardjito, serta pemeriksaan kadar 8-OHdG urin di Laboratorium Biologi Molekular, Fakultas Kedokteran Universitas Gadjah Mada, Yogyakarta pada Agustus, 2004. Sampel pada penelitian dipilih secara *consecutive sampling* (berturutan) pada siswa kelas 5 dan 6 yang melakukan kegiatan olah raga di lapangan yang memenuhi kriteria inklusi dan eksklusi yang ditetapkan oleh peneliti sejumlah 30 subyek.

Kriteria inklusi meliputi: (1) tipe kulit III-IV, (2) kelas 5-6, (3) sehat, (4) aktif mengikuti kegiatan olah raga di sekolah, (5) orang tua mengisi dan menandatangani formulir persetujuan penelitian. Kriteria eksklusi meliputi: (1) memakai suplementasi yang diduga mengandung antioksidan, (2) memakai tabir surya, (3) pelajar muslim yang memakai jilbab selama olah raga, (4) memakai *sensitizer* topikal seperti: sabun antiseptik maupun parfum.

### Jalannya Penelitian

Sebanyak 30 subyek melakukan olah raga di lapangan olah raga SD Sendangadi, Mlati sesuai jadwal sekolah (pukul 09.30-11.00), sebelum dan

sesudah olah raga dilakukan pengukuran indeks melanin dan kadar 8-OHdG urin.

### 1. Pengukuran 8-OHdG urin

Pengukuran kadar 8-OHdG urin dilakukan dengan metode ELISA kompetitif dengan kit antibodi 8-OHdG (*JAICA, Japan*). Sebelum dilakukan pengukuran dibuat kurva hubungan antara densitas optikal dan kadar 8-OHdG baku agar penentuan kadar 8-OHdG sampel dapat ditentukan.

Langkah-langkah pengukuran 8-OHdG urin adalah sebagai berikut: urin tampung 24 jam diambil dari 30 pelajar SD sebelum dan 24 jam sesudah olah raga dikumpulkan pada penampung bersih terhindar dari cahaya, kemudian dihomogenisasi, selanjutnya diambil 10 ml dan ditampung dalam tabung (*Falcon 2070*) dan disimpan pada suhu 4°C sampai siap digunakan. Pengukuran kadar 8 OHdG urin dilakukan sesuai dengan prosedur standar kit 8-OHdG, sebagai berikut: urin dalam tabung disentrifus (2000G) selama 10 menit, diambil 50ul supernatan ditambah dengan 50 il antibodi primer dimasukkan pada mikropate, kemudian ditutup dengan *adhesive plate* dan diinkubasi 37°C selama satu jam. Setelah tercampur campuran tersebut dibuang, kemudian dimasukkan 250 il larutan pencuci ke dalam plate, dicampur dengan baik, kemudian dibuang dan plate diletakkan di atas kertas tisu untuk menghilangkan sisa larutan pencuci. Langkah selanjutnya dimasukkan 100 il antibodi sekunder dan diinkubasi 37°C selama satu jam kemudian dicuci lagi dengan cara seperti di atas. Densitas optikal ditentukan dengan perubahan warna yang terjadi setelah pemberian 100 µl kromatin/3'3'5'5' *tetrametilbenzidin*, dan ditutup kertas aluminium diinkubasi selama 15 menit pada tempat gelap, kemudian diberikan 100 il *phosphoric acid IM* untuk menghentikan reaksi kromatin, dan dibaca dengan *ELISA reader* pada 450 nm.

### 2. Pengukuran IPD

Pengukuran pigmentasi kulit dilakukan sebelum berolah raga dan 24 jam setelah berolah raga dengan memakai meksameter (*Courage-Khazaka*). Pengukuran dilakukan pada S1 lengan atas pada sisi fleksor (kulit konstitutif) dan sisi ekstensor lengan bawah (kulit fakultatif). IPD ditentukan

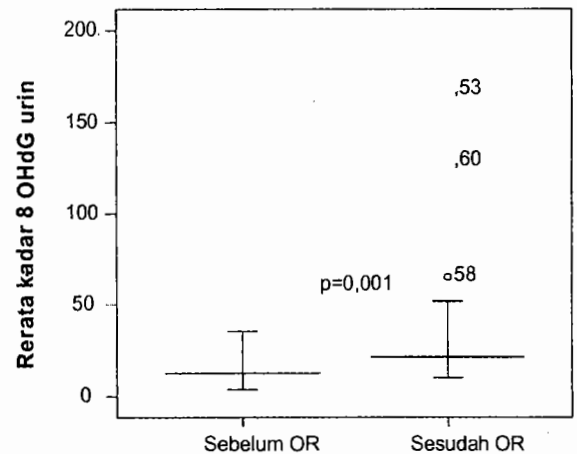
dengan membandingkan selisih warna kulit fakultatif dan konstitutif sesudah perlakuan dikurangi fakultatif dan konstitutif sebelum perlakuan.

### Analisis Statistik

Analisis statistik yang digunakan adalah uji *Mann-Whitney* untuk mengukur variabel non parametrik yang tidak terdistribusi normal, dan tes t berpasangan untuk variabel parametrik yang terdistribusi normal. Untuk menentukan hubungan antara perubahan kadar 8-OHdG pasca pajanan SM dan IPD digunakan diagram baur, dan diukur besar nilai korelasi digunakan uji korelasi Spearman dengan interval kepercayaan 95%. Pada penelitian ini meskipun data yang diperoleh merupakan data numerik, namun tidak terdistribusi normal sehingga tidak dapat digunakan data parametrik, maka digunakan uji korelasi Spearman. Dengan batas kemaknaan yaitu  $p = 0,05$ .

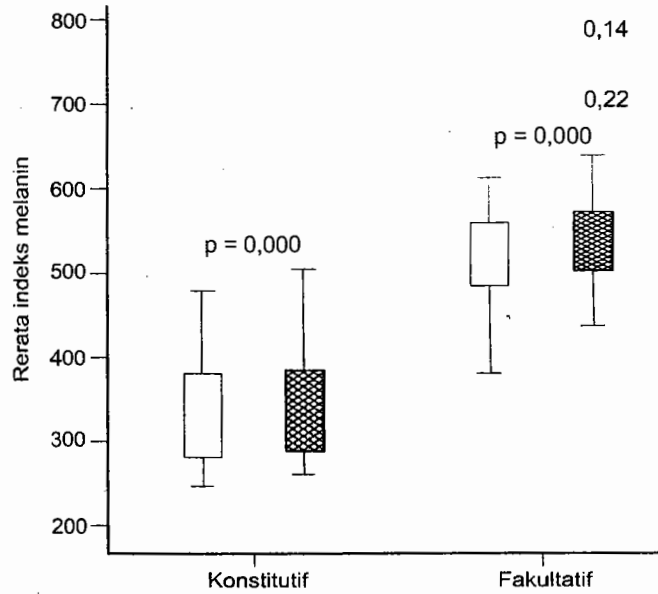
### HASIL

Subyek terdiri dari 15 anak laki-laki dan 15 wanita dengan usia rata-rata  $12,23 \pm 1,52$  tahun (9-16 tahun) tahun, dengan hasil sebagai berikut:



GAMBAR 1. Efek olah raga di area terbuka pada kadar 8-OHdG urin.

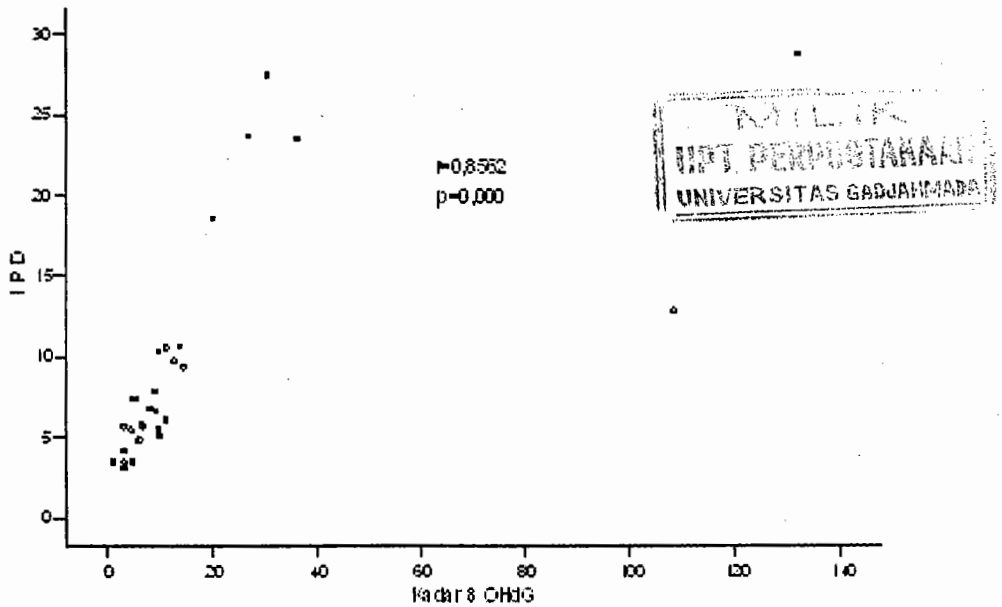
Pada GAMBAR 1 di atas tampak bahwa olah raga di area terbuka dapat meningkatkan kadar 8-OHdG urin sangat signifikan ( $p < 0,01$ ).



GAMBAR 2. Efek olah raga di area terbuka pada indeks melanin

Gambar di atas menunjukkan bahwa olah raga di area terbuka dapat meningkatkan indeks mel-

anin pada kulit fakultatif dan konstitutif secara sangat signifikan ( $p < 0,01$ )



GAMBAR 3. Korelasi antara kadar 8-OHdG urin dengan IPD

Pada GAMBAR 3 tampak diagram baur yang menunjukkan korelasi kuat ( $r > 0,8$ ) antara kadar 8-OHdG urin dan IPD

## DISKUSI

Pelajar SD yang sedang berolah raga dipilih sebagai subyek penelitian, dengan beberapa alasan antara lain: mereka adalah populasi sehat yang bebas dari kerusakan oksidatif yang berat, penyakit ginjal yang menyebabkan gangguan ekskresi urin, mudah untuk mengumpulkan urin tampung 24 jam selama penelitian berlangsung karena mobilitas rendah, dan mudah untuk dilakukan pemeriksaan kulit pada tubuh yang tertutup pakaian. Perubahan warna kulit akibat pajanan SM selama berolahraga pada anak mudah diukur.

Pada penelitian ini terbukti bahwa olah raga di bawah terik matahari menyebabkan peningkatan kadar 8-OHdG urin sangat bermakna ( $p < 0,01$ ). Hasil ini paralel dengan penelitian sebelumnya yang juga menunjukkan bahwa pajanan sinar UV menyebabkan peningkatan kadar 8-OHdG, seperti yang dilakukan oleh Hattori *et al.*, (1997) pada percobaan tikus yang dipajani SM, dan Ahmed *et al.*, (1999) pada penelitian epidermis manusia yang dipajani sinar UV.<sup>13,14</sup> Namun demikian, pembentukan 8-OHdG urin terjadi tidak hanya terjadi akibat pajanan SM saja tetapi juga terjadi akibat ROS yang terbentuk secara endogen karena metabolisme aerobik pada sel normal maupun proses metabolisme yang berlebihan.<sup>4</sup> Proses metabolisme tersebut terjadi akibat aktivitas yang berlebihan,<sup>15,16</sup> polutan udara,<sup>17</sup> merokok,<sup>18</sup> maupun penyakit kronis seperti dermatitis atopik,<sup>19</sup> diabetes melitus.<sup>20</sup>

Olah raga di bawah terik matahari pada penelitian ini juga meningkatkan pigmentasi pada kulit fakultatif dan konstitutif secara signifikan ( $p < 0,01$ ). Hal yang sama pernah dilakukan oleh Lenutaphong (1996) yang menunjukkan bahwa pajanan SM pada kulit fakultatif pada tipe kulit III-IV akan meningkatkan pigmentasi kulit.<sup>11</sup> Kulit konstitutif merupakan kulit yang tidak terpengaruh oleh pajanan SM, namun pada penelitian ini terjadi peningkatan indeks melanin sangat signifikan ( $p < 0,01$ ). Warna kulit konstitutif ditentukan oleh pigmen melanin dan hemoglobin yang keduanya terbaca oleh mexameter. Peningkatan pigmentasi pada kulit konstitutif dapat terjadi akibat pembentukan ROS secara sistemik, selain akibat pajanan SM yang menyebabkan oksidasi melanin

sehingga pada kulit konstitutif juga terjadi peningkatan indeks melanin.<sup>24</sup> Berdasarkan hal tersebut maka IPD ditentukan dengan membandingkan selisih warna kulit fakultatif dan konstitutif sesudah perlakuan dikurangi fakultatif dan konstitutif sebelum perlakuan.

Pada penelitian ini terbukti bahwa olah raga di bawah terik matahari menyebabkan perubahan kadar 8-OHdG urin dan IPD, dan uji korelasi Spearman menunjukkan korelasi kuat ( $r = 0,8562$ ). Pajanan SM akan menyebabkan reaksi fotooksidasi pada DNA, yang akan diikuti oleh pemulihan DNA, baik dengan glikosilasi maupun eksinukleasi, yang ditunjukkan oleh kenaikan kadar 8-OHdG urin.<sup>6,9</sup> ROS yang terbentuk selama berolah raga juga akan menyebabkan oksidasi melanin yang menyebabkan IPD.<sup>23</sup> Berbagai penelitian sebelumnya menunjukkan bahwa pemulihan DNA merupakan suatu sinyal terhadap peningkatan melanogenesis. Para ahli menduga bahwa enzim-enzim yang terlibat dalam *nucleotide excision repair* (NER), terutama kelompok endonuklease, selain memulihkan DNA rusak ternyata juga memicu sintesis melanin.<sup>24,25</sup> Pada penelitian ini terbukti bahwa terdapat korelasi yang kuat antara peningkatan kadar 8-OHdG dan IPD akibat olah raga di bawah terik matahari. Berdasarkan hasil tersebut maka IPD dapat digunakan untuk memprediksi kemampuan pemulihan DNA oksidatif setelah berolahraga di bawah terik matahari.

## SIMPULAN

Terdapat korelasi kuat antara IPD dengan perubahan kadar 8-OHdG urin setelah olahraga di bawah terik matahari ( $r = 0,8562$ ;  $p = 0,000$ ). Berdasarkan hal maka itu IPD dapat digunakan untuk memprediksi kemampuan pemulihan DNA oksidatif setelah berolahraga di bawah terik matahari terutama pada populasi yang mudah mengalami pigmentasi.

## KEPUSTAKAAN

1. Kochevar IE. Molecular and cellular Effect of UV radiation Relevant to chronic photodamage. Dalam: Gilchrest B.A., et al. eds. *Photodamage*. Cambridge MA: Blackwell Sciences, 1995; 51-67
2. Jung GE, Bohnert E. Photobiology of ultraviolet radiation induced DNA damage. In: Krutmann J and Elmets AC, eds. *Photoimmunology*. Blackwell Science Ltd. 1995; 34-41.

3. Bruskov IV, Malakhova V. Heat-induced formation of reactive oxygen species and 8-oxoguanine, a biomarker of damage to DNA. *Nucleic Acid Res*, 2002; 30: 1354-63.
4. Kasai H, Crain PF, Kuchino Y, Nishimura S, Ootsuyama A, Tanooka H.. Formation of 8-hydroxyguanosine moiety in cellular DNA by agent producing oxygen radicals and evidence for its repair. *Carcinogenesis*, 1989; 7: 1849-51.
5. Saito S, Yamaguchi H. Quantitative determination of urinary 8-OHdG by using ELISA. *Res Commun Mol Pathol Pharmacol*, 2000; 107(1-2): 39z-44
6. Cheng KC, Cahill DS, Kasai K, Nishimura S. 8-hydroxyguanine, an Abundant form of Oxidative DNA Damage, cause G → T and A→C Substitutions. *J Biol Chemistr*, 1991; 267 (1): 166-72.
7. Lampe J. Health effects of vegetables and fruit: assessing mechanisms of action in human experimental studies. *Am J clin Nutr*, 1999; 70: 475s-90s.
8. Helbock, Beckman KB, Shigenaga MK. DNA Oxidative matters; The HPLC-electrochemical detection assay of 8-oxo-deoxyguanosine and 8-oxo-guanine. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1998; 95: 288-93.
9. Mei S, Xu G, Xing J, Wu C. Method for the analysis of 8-Hydroxy-2-deoxyguanosine in urine by gas Chromatography. *Anal Sc*, 2001; 17: 779-781
10. Pathak MA, Fitzpatrick TB. Acute and chronic effects of the sun, dalam TB Fitzpatrick, AZ Eisen K, Wolff, IM Freedberg, KF Austen (eds.): *Dermatology in General Medicine*. 5<sup>th</sup> ed. New York: McGraw-Hill Book Co., 1999; 1627-38
11. Leenutaphong V. Relationship between skin color and cutaneous response to ultraviolet radiation in Thai. *Photodematol Photoimmunol Photomed*, 1996; 11(5): 198-203
12. Clarys P, Alewaeters K, Lambrecht, Barel AO. Skin Color Measurement: Comparison between three instrument; The chromameter, the dermaspectrometer and mexameter. *Skin res and tech*, 2000 4: 230-38.
13. Hattori Y, Nishigori, and C Tanaka. 8-Hydroxy-2-deoxyguanosine is increased in epidermal cells of hairless mice after chronic ultraviolet B exposure. *J Invest Dermatol*, 1997; 102: 733-37.
14. Ahmed UN, Ueda M, Nikaido O, Osawa T, Ichihashi M. High levels hydroxy-2-deoxyguanosine appear in normal human epidermis after a single dose of ultraviolet radiation. *Brit Dermatol*, 1999; 140: 226-31.
15. Sperati A, Abeni DD, Tagesson C, Forastiere F, Miceli MA, and Nelson O. Exposure to indoor background radiation and urinary concentrations of 8-hydroxydeoxyguanosine, a mark of oxidative DNA. *Env. Health Pospec*, 1999; 107(3): 213-15.
16. Reznick AZ, Vigule CA, Starke RP, and Packer L. Exercise, oxidative damage and effect of antioxidant manipulation, *J Nutr*, 1992; 122:766-73.
17. Calderon L, Lian Wen-Wang, and Yu-Jing Zhang. 8-Hydroxy-2-deoxyguanosine, A Major mutagenic oxidative DNA lesion, and strand breaks in nasal respiratory epithelium of children exposed to urban pollution. *environ Health Perspect*, 1999; 107: 469-74.
18. Asami S, Manabe H, Miyake, Tsurudome Y, Hirano T, Yamaguchi R, et al. Cigarette smoking induced an increase in oxidative DNA damage 8-hydroxydeoxyguanosine, in Central site of the human lung. *Carcinogenesis*, 1997; 18(9): 1763-66.
19. Tsuboi HI, Korudo K, Takeuchi H, Takigawa M, Masamoto Y, and Takeuchi M. 8-Hydroxydeoxyguanosine in urine as an index of oxidative damage to DNA in the evaluation of atopic dermatitis. *Brit Dermatol*, 1999; 138: 1033-35
20. Nishikawa T, Sasahara T, Kiritoshi S, Sonoda K, Senokuchi T, Matsuo T, and Kukidome D. Evaluation of urinary 8-hydroxydeoxyguanosine as a novel biomarker of macrovascular complications in type 2 diabetes. *Diabetes Care*, 2003; 26(5):1507-12
21. Lee JH, and Kim Ty. Relationship between constitutive skin color and ultraviolet light sensitivity in Korea, *Photodematol Photoimmunol Photomed*, 1999; 15: 231-35.
22. Nordlund JJ. Introduction to the biology of pigment system. Dalam: Moschella SL, Hurley HJ, (eds). *Dermatology*. 3<sup>rd</sup> ed, Philadelphia: WB Saunders Company, 1992: 1421-41
23. Gilschrest BA, Park HY, Eller MS, and Yaar M. Mechanisms of ultraviolet light-induced pigmentation. *Photochem photobiol*, 1996; 63(1):1-10
24. Gilschrest BA. and Eller MS. DNA photodamage stimulates melanogenesis and other photoprotective response. *J Invest Dermatol*, 1999; 4(1): 35-40
25. Boer de J and Hoeijmakers HJ. Nucleotide excision repair and human syndromes. *Carcinogenesis*, 2000; 21(3): 453-60.