

Peran vitamin C pada viabilitas keratinosit dan sel HeLa yang dipajan sinar UVB

Iryani Andamari, Fajar Waskito, Soedirman S
Bagian Ilmu Kesehatan Kulit dan Kelamin
Fakultas Kedokteran Universitas Gadjah Mada/RS. Dr. Sardjito
Yogyakarta

ABSTRACT

Iryani Andamari, Fajar Waskito, Soedirman S - *Role of Vitamin C on the viability of the keratinocyte and HeLa cell with irradiation of UVB ray.*

Background: Ultraviolet B (UVB) exposure is one of the external factors which can cause reduction of cell viability through photochemistry reaction and can be managed using antioxydant. Failures of DNA repair and apoptosis have some important roles in photocarcinogenesis.

Objective: This research is aimed to know the effect of vitamin C on the viability of UVB irradiated keratinocytes and HeLa cells.

Method: This research employed a simple experimental method. Two groups of cells used in this research were: Group I normal foreskin keratinocytes passage III, and Group II HeLa cells. Each group was divided into 25 sub-groups consisting of 2×10^4 cells each, treated with vitamin C at 0, 6, 12, 40, 200 $\mu\text{g/ml}$ concentrations, and UVB irradiated (Phillips UVB TL40W/12RS) at 0, 200, 400, 800, 1600 mJ/cm^2 intensities. Each treatment was done in quintet. Viable cells were determined based on formazan blue reaction using ELISA-reader 550 nm 24 hours after treatment. The results were analyzed by independent t-test, one-way ANOVA, and multivariate analysis using three-way analysis of variance.

Result: Vitamin C at 6, 12, 40, and 200 $\mu\text{g/ml}$ concentrations significantly increased normal keratinocyte and HeLa cells viability which were not irradiated by UVB, statistically significant, compared to normal keratinocyte and HeLa cells which were not treated with vitamin C. HeLa cells, which were irradiated by UVB at 200, 400, and 800, 1600 mJ/cm^2 intensities and treated with vitamin C at 6, 12, 40 and 200 $\mu\text{g/ml}$ concentrations, statistically significant in decreasing cell viability.

Conclusion: Vitamin C at 200 $\mu\text{g/ml}$ concentration, which was given to normal keratinocytes irradiated by UVB at 200, 400, 800, and 1600 mJ/cm^2 intensities used in this research showed its protection effect, thus enhancing the viability of the cell. Vitamin C 6, 12, 40 $\mu\text{g/ml}$, which were irradiated with UVB at 200, 400, 800, and 1600 mJ/cm^2 intensities, did not show protection effect. HeLa cells were less resistant than normal keratinocytes to UVB irradiation at 200, 400, 800, and 1600 mJ/cm^2 intensities.

Key words: vitamin-C, HeLa cell, keratinocyte, cell viability, UVB

ABSTRAK

Iryani Andamari, Fajar Waskito, Soedirman S - *Peran vitamin C pada viabilitas keratinosit dan sel HeLa yang dipajan sinar UVB*

Latar Belakang: Sinar Ultraviolet B (UVB) merupakan salah satu faktor eksternal yang mampu menurunkan viabilitas sel melalui reaksi fotokimia. Hal ini dapat dikendalikan dengan antioksidan. Kegagalan pemulihan DNA dan apoptosis berperan penting pada terjadinya fotokarsinogenesis.

Tujuan: Penelitian ini bertujuan untuk melihat efek pemberian vitamin C terhadap viabilitas keratinosit normal dan sel HeLa yang dipajan sinar UVB.

Bahan dan cara: Rancangan penelitian ini menggunakan metode eksperimental sederhana. Dua kelompok sel yang digunakan yaitu: Kelompok I yang terdiri dari keratinosit normal pasase-III, dan Kelompok II yang tersusun oleh sel HeLa. Tiap kelompok dibagi menjadi 25 sub-kelompok, masing-masing terdiri dari 2×10^4 sel, diberi vitamin C: 0, 6, 12, 40, 200 $\mu\text{g/ml}$ dan dipajan UVB: 0, 200, 400, 800, 1600 mJ/cm^2 (Phillips UVB TL40W/12RS). Melakukan secara kuintet (5x). Sel viabel dinilai berdasarkan reaksi *formazan blue* dengan menggunakan ELISA-reader 550 nm 24 jam pasca perlakuan. Hasil penelitian dianalisis dengan uji t, ANOVA satu jalan, dan ANOVA tiga jalan.

Hasil: Vitamin C dengan konsentrasi 6, 12, 40, dan 200 µg/ml meningkatkan viabilitas keratinosit normal dan sel HeLa yang tidak dipajan UVB, bermakna secara statistik, dibanding keratinosit normal dan sel HeLa tanpa pemberian vitamin C. Sel HeLa yang dipajan UVB 200, 400, 800, dan 1600 mJ/cm², dengan pemberian vitamin C 6, 12, 40, dan 200 µg/ml secara statistik bermakna menurunkan viabilitas sel.

Simpulan: Vitamin C 200 µg/ml yang diberikan pada keratinosit normal yang dipajan UVB dengan intensitas 200, 400, 800, dan 1600 mJ/cm² memberi efek proteksi dan meningkatkan viabilitas sel. Vitamin C 6, 12, 40 µg/ml yang dipajan UVB dengan intensitas 200, 400, 800, dan 1600 mJ/cm² tidak memberi efek proteksi. Sel HeLa tidak lebih resisten daripada keratinosit normal terhadap pajanan UVB pada intensitas 200, 400, 800, dan 1600 mJ/cm².

(B.I.Ked. Vol. 36, No.4: 215-223, 2004)

PENGANTAR

Berbagai efek radiasi sinar ultraviolet (SUV) bermanfaat bagi kehidupan manusia, di antaranya sintesis vitamin D, dan fototerapi. Bagaimanapun juga, pajanan SUV surya yang berlebihan berefek buruk terhadap kulit manusia, antara lain: terbakar surya dan hiperpigmentasi,¹ penuaan kulit dini,² dan fotokarsinogenesis.^{2,3} Ultraviolet B (UVB) merupakan salah satu spektrum SUV yang dapat menyebabkan terjadinya kerusakan DNA secara langsung melalui pembentukan dimer siklobutan pirimidin (*cyclobutyl pyrimidin dimer/CPD*) dan 6-4 *photoproduct*, atau secara tidak langsung melalui pembentukan spesies oksigen reaktif (SOR).^{4,5}

Pajanan SUV dapat berperan di dalam ketiga tahapan proses karsinogenesis, yaitu inisiator, promotor, dan konversi maligna.⁶ Berbeda dengan sel normal, sel kanker lebih resisten terhadap pacuan apoptosis karena sel kanker dapat menggunakan berbagai mekanisme untuk menghindari pacuan apoptosis tersebut. Sebagian besar sel yang menyusun epidermis adalah keratinosit. Pada keratinosit normal, mitosis aktif dilakukan oleh sel basal.^{7,8} Dalam kultur keratinosit, subkultur dipertimbangkan untuk digunakan dalam eksperimen karena akan didapatkan sel yang seragam sesuai dengan yang dikehendaki dan dapat dipertahankan.⁸ Di antara berbagai *cell line* pada kultur, sel HeLa adalah *cell line* turunan sel karsinoma skuamosa servik manusia, dengan sifat-sifat sel karsinoma skuamosa yang masih melekat. Sel ini memiliki kelebihan karena sangat mudah dibiakkan tanpa tergantung hormon pertumbuhan.⁹ Pengaruh pajanan SUV pada viabilitas sel-sel ini belum diketahui.

Vitamin C adalah vitamin yang larut dalam air, merupakan salah satu dari berbagai antioksidan non

enzimatik yang dapat menangkap oksidan dan radikal bebas,¹⁰ dan sebagai prooksidan yang dapat meningkatkan kematian sel akibat stres oksidatif di dalam sel kanker.² Oleh karena itu perlu diketahui perbedaan pengaruh pemberian vitamin C terhadap efek sitotoksik pajanan UVB pada keratinosit normal dan sel HeLa. Penelitian ini bertujuan untuk melihat efek sitotoksik akibat pajanan UVB pada viabilitas keratinosit normal dan sel HeLa yang diberi vitamin C.

BAHAN DAN CARA

Sel HeLa dan kultur keratinosit manusia

Kulit manusia sehat didapatkan dari sirkumsisi. Kulit dipotong menjadi kurang lebih 2cm², jaringan lemak dilepaskan. Epidermis dan dermis dipisahkan dengan menggunakan tripsin 0,25%. Epidermis dan larutan tripsin-EDTA dipindah ke dalam tube sentrifus, kemudian disentrifus dengan kecepatan 1000-1500 RPM, kurang lebih 5 menit, kemudian diinkubasi di dalam 5%CO₂ (15 menit), 37°C. Sementara itu, sel diaspirasi menggunakan pipet steril untuk membantu disosiasi sel. *Stop solution* (5% FBS dilarutkan dalam PBS) digunakan untuk menghambat aktivitas tripsin. Suspensi kemudian disentrifus selama 5 menit, supernatant kemudian dibuang, *cell pellet* diresuspensi di dalam media kultur. Sel kemudian dihitung untuk menentukan jumlah sel hidup yang akan digunakan di dalam penelitian. Sel kemudian dikultur dengan menggunakan medium *defined keratinocyte serum free* untuk mendapatkan keratinosit. Keratinosit kemudian di subkultur sampai dengan subkultur ketiga. *Cell line* HeLa didapatkan dari *London School of Hygiene and Tropical Disease, UK*.

Vitamin C

Satu ampul yang berisi 5ml larutan mengandung 1 gram vitamin C (Roche-French). Penelitian ini menggunakan vitamin C bentuk larutan, konsentrasi yang digunakan adalah: 0, 6, 12, 40, 200 µg/ml.

Sumber UVB

Sumber sinar UVB yang digunakan dalam penelitian adalah UVB-BB 6 lampu, 40W/12 RS, Phillips-Holland (285-350 nm). Intensitas *flux* diukur dengan menggunakan radiometer UV (Custom-Japan).

Perlakuan

Subjek dibagi menjadi 2 grup yang terdiri dari: Grup I Kelompok I yang terdiri dari keratinosit normal pasase-III, dan Kelompok II yang tersusun oleh sel HeLa. Tiap kelompok dibagi menjadi 25 subkelompok, masing-masing terdiri dari 2×10^4 sel, dimasukkan ke dalam sumuran, diberi vitamin C: 0, 6, 12, 40, 200 µg/ml dan dipajan UVB: 0, 200, 400, 800, 1600 mJ/cm². Perlakuan dilakukan secara kuintet (5x percobaan).

Masing-masing kelompok sel kemudian diberi vitamin C kecuali grup kontrol, kemudian diinkubasi selama 24 jam. Selanjutnya, sel dipajan UVB dengan intensitas tersebut di atas. Sel kemudian diberi MTT (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (Sigma) 10 il/sumuran, diikuti inkubasi seluruh sel yang dikultur selama 4 jam pada suhu 37°C. Sebagai *stop solution* digunakan 5% SDS (*Sodium deducyl sulphate*) dalam 0,01% yang ditambahkan ke dalam seluruh sumuran sel yang dikultur yang telah diberi MTT, kemudian diinkubasi *overnight*. Sel *viable* ditentukan berdasarkan reaksi *formazan blue* dengan menggunakan ELISA *plate reader* pada panjang gelombang 550 nm dengan satuan *optic density* (OD).

Penelitian dilakukan di Laboratorium Hayati Universitas Gadjah Mada pada bulan Mei tahun 2004.

HASIL

Pada TABEL 1 ditunjukkan rerata banyaknya sel viabel pada kelompok sel yang diberi vitamin C

dengan konsentrasi 6, 12, 40 dan 200 µg/ml tanpa pajanan UVB, dan kelompok sel yang diberi vitamin C dengan konsentrasi 6, 12, 40 dan 200 µg/ml yang dipajan UVB intensitas 200, 400, 800 dan 1600 mJ/cm².

Hipotesis yang diuji adalah pengaruh vitamin C terhadap keratinosit normal dan sel HeLa (kelompok sel) yang dipajan UVB, apakah kadar vitamin C bersama dosis UVB memiliki nilai yang signifikan terhadap variabel tergantung (viabilitas sel). Hasil statistik uji-F menunjukkan:

$$F_0=136,5264; \text{ nilai } p=0,0000 < \alpha=0,05$$

Jadi pengaruh vitamin C terhadap viabilitas keratinosit normal dan sel HeLa yang dipajan UVB mempunyai nilai yang signifikan.

Pengaruh pemberian vitamin C dan intensitas pajanan UVB pada kedua kelompok sel dapat dilihat pada GAMBAR 1. Secara keseluruhan rerata banyaknya sel viabel lebih besar pada kelompok sel HeLa. Dalam keadaan tanpa pajanan UVB pengaruh vitamin C jelas terlihat. Grafik memperlihatkan adanya perubahan rerata banyaknya sel viabel pada kelompok keratinosit dengan dosis vitamin C sebesar 200 µg/ml.

Terdapat perubahan yang bermakna rerata banyaknya sel viabel pada kelompok keratinosit normal dengan dosis vitamin C 200 µg/ml dan pajanan UVB 200 mJ/cm² ($p < 0,01$). Pada kelompok keratinosit normal dengan dosis vitamin C 200 µg/ml dan pajanan UVB 400 mJ/cm² ($p < 0,01$), terjadi pengaruh bermakna secara statistik. Pada kelompok sel HeLa rerata banyaknya sel viabel antara sel HeLa tanpa vitamin C dan sel HeLa yang diberi vitamin C 6 dan 12 µg/ml menurun secara signifikan ($p < 0,05$). Dapat ditunjukkan pula adanya perubahan bermakna pada rerata banyaknya sel viabel pada kelompok keratinosit normal dengan konsentrasi vitamin C 200 µg/ml dan pajanan UVB 800 mJ/cm² ($p < 0,01$). Pada kelompok sel HeLa terdapat penurunan bermakna rerata banyaknya sel viabel pada konsentrasi vitamin C 6, 12, dan 40 µg/ml, kemudian meningkat kembali seiring dengan ditingkatkannya konsentrasi vitamin C sampai 200 µg/ml.

Pajanan UVB dengan intensitas sebesar 1600 mJ/cm² berbeda dengan keadaan intensitas UVB di bawah 1600 mJ/cm², pada penelitian ini. Pada kelompok keratinosit pengaruh vitamin C pada

TABEL 1. Perbandingan Rerata Banyaknya Sel Hidup (Keratinosit Normal and Sel HeLa) Menurut Konsentrasi Vitamin C and Intensitas Paparan UVB

| | Vit C (µg/ml) | Statistik | Tanpa UVB (0) | Intensitas Paparan UVB (mJ/cm ²) | | | |
|--------------------|---------------|-----------|---------------|--|--------|--------|--------|
| | | | | 200 | 400 | 800 | 1600 |
| Keratinosit Normal | 0 | Rerata | 0,1382 | 0,1170 | 0,1272 | 0,1794 | 0,1348 |
| | | SD | 0,0054 | 0,0027 | 0,0041 | 0,0905 | 0,0398 |
| | 6 | Rerata | 0,9404 | 0,1216 | 0,1290 | 0,1416 | 0,2162 |
| | | SD | 0,0864 | 0,0040 | 0,0035 | 0,0079 | 0,1272 |
| | | <i>p</i> | | 0,9146 | 0,8818 | 0,7675 | 0,0809 |
| | | Rerata | 1,3100 | 0,1284 | 0,1312 | 0,1496 | 0,1336 |
| | 12 | SD | 0,1259 | 0,0102 | 0,0013 | 0,0077 | 0,0232 |
| | | <i>p</i> | | 0,8741 | 0,8558 | 0,9500 | 0,0768 |
| | 40 | Rerata | 1,3544 | 0,1350 | 0,1380 | 0,1456 | 0,1336 |
| | | SD | 0,1645 | 0,0102 | 0,0033 | 0,0065 | 0,0177 |
| | | <i>p</i> | | 0,8778 | 0,5788 | 0,9750 | 1,0000 |
| | | Rerata | 1,1550 | 0,6636 | 0,2646 | 0,9664 | 0,1950 |
| 200 | SD | 0,1654 | 0,1491 | 0,0418 | 0,4364 | 0,0767 | |
| | <i>p</i> | | 0,0000 | 0,0000 | 0,0000 | 0,1808 | |
| Sel HeLa | 0 | Rerata | 0,3594 | 0,3510 | 0,3386 | 0,3600 | 0,3464 |
| | | SD | 0,0263 | 0,0121 | 0,0087 | 0,0249 | 0,0135 |
| | 6 | Rerata | 1,5518 | 0,3230 | 0,3058 | 0,3014 | 0,2844 |
| | | SD | 0,0661 | 0,0229 | 0,0013 | 0,0067 | 0,0050 |
| | | <i>p</i> | | 0,0409 | 0,0004 | 0,0000 | 0,0468 |
| | | Rerata | 1,6036 | 0,3240 | 0,3100 | 0,3022 | 0,2862 |
| | 12 | SD | 0,0734 | 0,0107 | 0,0016 | 0,0065 | 0,0069 |
| | | <i>p</i> | | 0,9386 | 0,5928 | 0,9437 | 0,9516 |
| | 40 | Rerata | 1,5632 | 0,3488 | 0,3408 | 0,3120 | 0,2962 |
| | | SD | 0,0169 | 0,0233 | 0,0223 | 0,0067 | 0,0072 |
| | | <i>p</i> | | 0,0672 | 0,0007 | 0,3917 | 0,7361 |
| | | Rerata | 1,4364 | 0,3472 | 0,3604 | 0,3640 | 0,3790 |
| 200 | SD | 0,0239 | 0,0269 | 0,0130 | 0,0285 | 0,1020 | |
| | <i>p</i> | | 0,9019 | 0,0196 | 0,0002 | 0,0122 | |

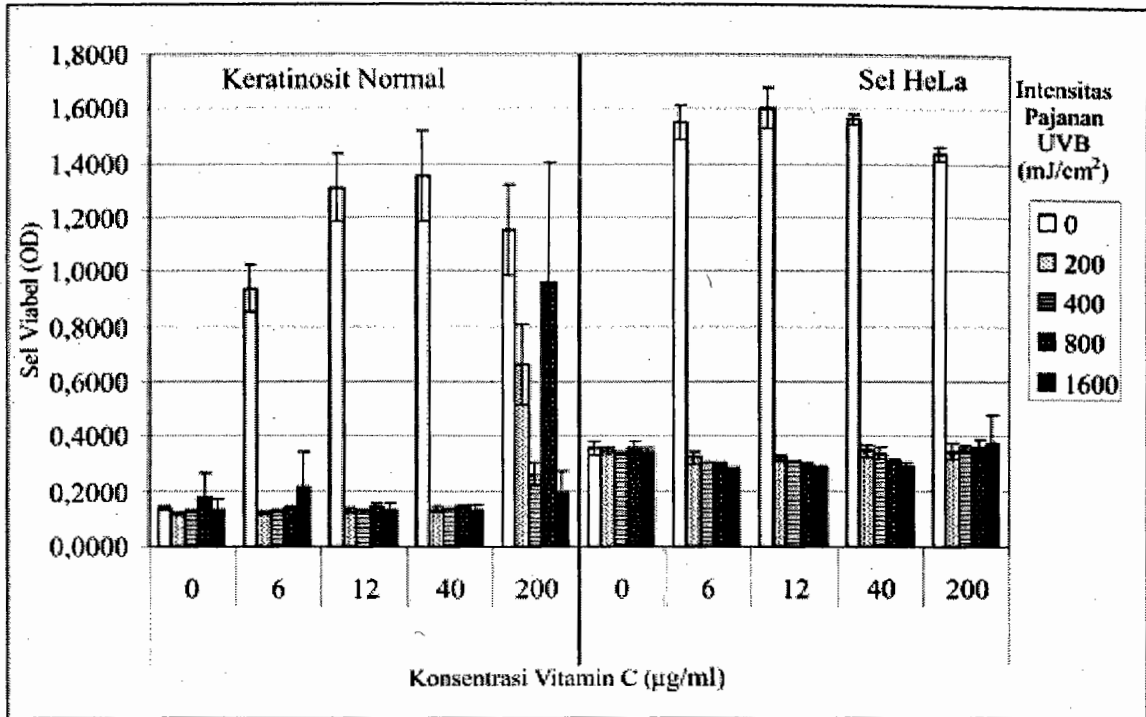
ANOVA (3 jalan): kelompok sel, vitamin C, UVB: $F = 136,5264$; p -value = 0,0000

TABEL 2. *p*-value (*t*-test) dari Sel Viabel antara Keratinosit Normal dan Sel HeLa

| Konsentrasi Vit C (µg/ml) | Intensitas Paparan UVB (mJ/cm ²) | | | |
|---------------------------|--|--------|--------|--------|
| | 200 | 400 | 800 | 1600 |
| 0 | 0,0000 | 0,0000 | 0,0093 | 0,0001 |
| 6 | 0,0000 | 0,0000 | 0,0000 | 0,2969 |
| 12 | 0,0000 | 0,0000 | 0,0000 | 0,0000 |
| 40 | 0,0000 | 0,0000 | 0,0000 | 0,0000 |
| 200 | 0,0082 | 0,0051 | 0,0365 | 0,0122 |

peningkatan viabilitas sel secara statistik tidak bermakna ($p > 0,05$). Pada kelompok sel HeLa, pengaruh vitamin C hanya terjadi pada konsentrasi vitamin C 6 µg/ml, statistik bermakna ($p < 0,05$).

Viabilitas sel HeLa mulai meningkat lagi pada pemberian vitamin C 200 µg/ml dibanding dengan sel HeLa tanpa pemberian vitamin C, namun memiliki nilai SD yang tinggi.



GAMBAR 1. Perbandingan Rerata Viabilitas Keratinosit Normal dan Sel HeLa Menurut Intensitas Paparan UVB dan Konsentrasi Vitamin C.

PEMBAHASAN

Tujuan penelitian ini adalah melihat efek pemberian vitamin C terhadap viabilitas keratinosit normal dan sel HeLa yang dipajan sinar UVB. Sebagai subjek penelitian adalah keratinosit normal dan sel HeLa. Keratinosit merupakan sel utama epidermis yang memiliki struktur sangat terorganisasi, tersusun atas membran sel, inti sel, sitoplasma dengan organelnya.¹¹ Keratinosit normal juga memiliki kemampuan untuk membelah diri karena mitosis aktif terjadi pada sel basal.^{7,8}

Pada penelitian ini keratinosit normal yang digunakan berasal dari preputium daerah yang terbebas sinar matahari dari anak usia 13 tahun. Jadi diharapkan kecil kemungkinan mengalami mutasi. Makin tua usia donor makin besar kemungkinan terpajan sinar matahari, makin tinggi kumulatif paparan SUV akan berakibat timbulnya mutasi gen. Subjek penelitian (subkultur keratinosit) ini berbeda dengan penelitian sebelumnya yang menggunakan kulit donor bayi baru lahir. Keuntungan pemakaian keratinosit sebagai subjek pada penelitian ini adalah

dapat dibiakkannya *in vitro*, di dalam pembiakkannya tidak diperlukan sel *feeder*, di dalam media bebas-serum ditambah faktor pertumbuhan, dan dengan konsentrasi Ca^{2+} yang relatif rendah.⁸ Pada penelitian ini pertumbuhan keratinosit pada kultur primer dipertahankan dengan pemberian *coating* kolagen pada *flask* sehingga diharapkan aktivitas proliferasi keratinosit optimal. Digunakannya subkultur III (*passage* III) keratinosit pada penelitian ini adalah untuk mendapatkan uniformitas sel yang secara biologik bermakna yang tidak didapatkan pada kultur primer. Subkultur dipertimbangkan untuk dapat digunakan secara praktis, dapat disimpan dengan penggantian media yang sesuai dan teratur, dapat dilakukan penggantian jumlah sel, didapatkan jenis sel yang seragam dan siap digunakan di dalam eksperimen.⁸

Pada penelitian ini sel HeLa digunakan untuk mewakili sel kanker. Sel HeLa adalah salah satu jenis sel kanker ganas, yang pertama kali ditemukan oleh dokter John and Margaret Gey di John Hopkins University pada tahun 1951, yang berasal dari sampel sel kanker servik seorang penderita yang

bernama Henrietta Lacks. Penelitian terhadap sel HeLa telah dilakukan oleh para peneliti di seluruh dunia selama lebih dari 45 tahun.^{9,12} *Cell line* HeLa juga telah didistribusikan ke seluruh penjuru dunia untuk keperluan penelitian, sehingga sel HeLa untuk penelitian ini mudah diperoleh.

Vitamin C digunakan pada penelitian ini karena sifat dasarnya yang berfungsi sebagai antioksidan biologis non-enzimatik dan bersifat larut dalam air, maupun sifatnya sebagai prooksidan yang membantu terjadinya kerusakan kulit akibat radikal bebas. Sebagai antioksidan vitamin C berperan menangkap radikal bebas. Pada penelitian eritrosit manusia yang dipajan UVB dengan intensitas 1,6 J/cm², yang bertujuan untuk melihat pengaruh vitamin C terhadap terjadinya fotohemolisis, ditunjukkan bahwa vitamin C tidak berperan sebagai fotoprotektor. Penelitian yang menggunakan eritrosit manusia tersebut dilakukan pada relawan yang sebelum mengikuti penelitian mengkonsumsi vitamin C sebesar 2 gram/hari selama 1 minggu.¹³ Bentuk sediaan yang digunakan pada penelitian ini didasarkan pada suatu penelitian klinis pada *cell line* limfosit manusia dan leukemia bahwa vitamin C yang diberikan secara intravena,¹⁵ dalam bentuk larutan dapat bertindak sebagai prooksidan dan menyebabkan terjadinya apoptosis pada sel kanker tersebut.¹⁴ Besarnya konsentrasi yang digunakan pada penelitian ini didasarkan atas dosis vitamin C harian sebesar 60 mg dan absorpsi sebesar 75% yang cukup optimal melalui pemberian vitamin C dengan dosis 1 gram.¹⁶

Sinar UVB dipilih sebagai perlakuan dalam penelitian ini sebab sinar UVB memiliki sifat karsinogenik. Meskipun intensitas sinar UVB pada saat mencapai permukaan bumi relatif rendah, tetapi dapat menimbulkan efek pada kulit baik secara langsung maupun tidak langsung.² Pada penelitian keratinosit normal manusia, pajanan sinar UVB dengan dosis 100 mJ/cm² cenderung menurunkan katalase dan aktivitas *superoxide dismutase* (SOD).¹⁷ Studi yang dilakukan oleh Budiyanto *et al.* (2002) menunjukkan bahwa pajanan UVB *broad band* pada kulit tikus naracoba dengan intensitas 300 mJ/cm² dapat menghasilkan 8-OHdG, ini merupakan penanda adanya kerusakan DNA.¹⁸ Penelitian sebelumnya menunjukkan adanya per-

bedaan spektrum SUV dalam menimbulkan kerusakan DNA, baik pembentukan CPD maupun 8-OHdG.^{18,19,20}

Pada penelitian ini pemberian vitamin C pada keratinosit normal yang tidak dipajan UVB meningkatkan viabilitas keratinosit normal dan sel HeLa, bermakna secara statistik. Namun demikian, nilai SD yang relatif tinggi pada vitamin C dengan konsentrasi 12, 40, dan 200 µg/ml menggambarkan adanya variasi sel viabel yang besar antar kelompok sel. Inkubasi selama 24 jam pada kelompok sel yang diberi vitamin C dengan berbagai konsentrasi menghasilkan bertambahnya rerata banyaknya sel viabel. Dugaan lain adalah adanya efisiensi *plating*. Demikian pula waktu yang digunakan untuk perlakuan memberi peluang terjadinya reaksi antara vitamin C dengan oksigen.

Sel HeLa yang tidak diberi vitamin C yang dipajan UVB dengan berbagai intensitas pada penelitian ini resisten terhadap kematian sel yang ditimbulkan akibat pajanan UVB. Dosis letal pada penelitian ini tidak dapat ditunjukkan. Faktor pajanan UVB kemungkinan mempengaruhi kondisi ini. Pajanan tunggal dalam waktu singkat terkadang belum dapat menentukan kematian sel, pajanan yang berulang/seri dengan intensitas rendah justru memiliki efek yang lebih jelas pada viabilitas sel.²¹ Kelemahan esai MTT berupa kondisi inkubasi, maupun konsentrasi MTT, juga dapat sebagai faktor yang kemungkinan berperan di dalam penelitian ini, dan tidak dapat dihindari. Pada penelitian yang menggunakan keratinosit manusia sebagai subjek, pajanan UVB dengan intensitas 1090 mJ/cm² masih belum mempengaruhi viabilitas sel tersebut sehingga kerusakan oksidatif yang diterima oleh sel tersebut belum mampu mematikan sel.²²

Beberapa kelompok sel mempunyai SD yang relatif tinggi kemungkinan dipengaruhi oleh perbedaan rerata sel viabel yang cukup besar pada kelompok-kelompok sel tersebut. Semakin besar intensitas pajanan yang digunakan semakin besar waktu yang digunakan, keadaan ini akan memberi peluang faktor tegangan dan/atau kekuatan arus listrik berperan pada saat dilakukan pajanan pada penelitian ini. Tegangan dan arus listrik akan mempengaruhi besarnya energi yang ditimbulkan, dan energi berbanding lurus dengan intensitas

cahaya.²³ Pengamatan viabilitas sel pada penelitian ini menggunakan prinsip pengujian sitotoksik berdasar esai MTT, yaitu dengan membedakan sel-sel yang tetap memiliki viabilitas (daya hidup) antara sel yang dapat mengalami proliferasi dengan sel yang tidak dapat mengalami proliferasi. Banyaknya sel yang bertahan hidup ditentukan secara tidak langsung dengan MTT.²

Dalam proses kematian sel yang diakibatkan oleh pajanan sinar UVB, vitamin C dapat menghambat atau mempercepat terjadinya kematian sel, tergantung pada kondisi lingkungan.^{24,25} Pada Tabel 1 dan Gambar 1 dapat dilihat bahwa inkubasi vitamin C pada sel HeLa selama 24 jam sebelum dilakukan pajanan UVB pada penelitian ini memberi peluang sel HeLa untuk berproliferasi. Kecenderungan lebih banyaknya sel viabel pada sel HeLa dibanding dengan keratinosit normal yang diberi berbagai konsentrasi vitamin C (tanpa pajanan UVB) pada kondisi awal, secara statistik terdapat perbedaan bermakna ($p < 0,01$). Hal ini sesuai dengan sifat sel HeLa yang memiliki kemampuan proliferasi yang relatif lebih cepat dibanding keratinosit normal akibat aktivitas telomerase yang dimilikinya.⁹ Pada penelitian ini intensitas maksimal pajanan UVB tunggal yang digunakan lebih besar daripada penelitian Punnonen *et al.* (1991) yang menggunakan keratinosit yang dipajani UVB 1090 mJ/cm² dan menunjukkan viabilitas keratinosit yang tidak berubah.²²

Pada penelitian keratinosit normal (sel HaCaT) ditunjukkan bahwa akumulasi asam askorbat intraselular menghasilkan efek proteksi yang bermakna terhadap kematian sel akibat pajanan UVB.²⁶ Penelitian sel HaCaT ini berbeda dengan penelitian Eberlein-Konig *et al.* (1997) yang telah disebutkan sebelumnya bahwa vitamin C tidak dapat berperan sebagai fotoprotektor pada eritrosit manusia yang dipajani UVB.¹³ Pada penelitian ini, sel HeLa yang dipajani UVB dengan intensitas 400, 800 dan 1600 mJ/cm² dan diberi vitamin C dengan konsentrasi 6, 12, dan 40 µg/ml rerata viabilitas sel HeLa lebih rendah dibanding dengan sel HeLa yang diberi vitamin C dengan konsentrasi 200 µg/ml. Vitamin C 200 µg/ml memberi efek toksik terhadap keratinosit yang dipajani UVB 1600 mJ/cm², tetapi tidak bersifat toksik terhadap sel HeLa, sesuai dengan penelitian yang dilakukan sebelumnya

meskipun konsentrasi vitamin C yang diberikan berbeda dan dengan metode yang berbeda.²⁷

Secara klinis, terjadinya efek sitotoksik akibat pajanan SUV tergantung pada dosis bahan fototoksik dan intensitas pajanan yang sesuai.²⁸ Penelitian lain yang menggunakan keratinosit manusia pada subkultur kedua (*passage II*) yang berasal dari kulit preputium bayi baru lahir yang diberi asam askorbat derivat askorbil palmitat (AA6P) 30 menit sebelum dipajani dengan UVB dengan intensitas 200 J/m² selama 30 menit, menunjukkan bahwa di samping AA6P dapat bertindak sebagai antioksidan, dapat pula menyebabkan terjadinya kerusakan kulit setelah pajanan SUV.²⁹ Studi lain membuktikan peran vitamin C pada kondisi tertentu dapat berfungsi sebagai prooksidan akibat adanya logam-logam bebas, di antaranya Cu²⁺, Fe³⁺.³⁰ Efek vitamin C sebagai prooksidan dan proapoptotik kemungkinan berhubungan dengan hidroksilasi dan atau formasi radikal askorbil.¹⁴

Konsentrasi vitamin C 200 µg/ml meningkatkan rerata viabilitas keratinosit normal yang dipajani UVB dengan berbagai intensitas, dibanding dengan keratinosit normal yang diberi vitamin C dengan konsentrasi vitamin C 6, 12, dan 40 µg/ml. Pada sel HeLa yang dipajani UVB 200, 400, 800, dan 1600 mJ/cm² tanpa pemberian vitamin C hasil cenderung konstan, kemungkinan berhubungan dengan hilang atau menurunnya peran p53 yang meningkatkan ekspresi gena *Bcl-2*.³¹ Pada sel HeLa yang dipajani UVB dengan berbagai intensitas, pemberian vitamin C dengan berbagai konsentrasi tidak mengubah radikal bebas ke dalam hidrogen peroksida yang dapat merusak membran sel, dan menurunnya ekspresi protein p53 menyebabkan penurunan ekspresi Bax sehingga pada penelitian ini pada sel HeLa gagal terjadi apoptosis.

SIMPULAN

Vitamin C 200 µg/ml yang diberikan pada keratinosit normal yang dipajani UVB dengan intensitas 200, 400, 800, dan 1600 mJ/cm² memberi efek proteksi dan meningkatkan viabilitas sel. Vitamin C 6, 12, 40 µg/ml yang dipajani UVB dengan intensitas 200, 400, 800, dan 1600 mJ/cm² tidak

memberi efek proteksi. Sel HeLa tidak lebih resisten daripada keratinosit normal terhadap pajanan UVB pada intensitas 200, 400, 800, dan 1600 mJ/cm².

UCAPAN TERIMA KASIH

Ucapan terima kasih disampaikan kepada Prof. Henk Smith (London School of Hygiene and Tropical Disease, UK) yang telah menyediakan *cell line* HeLa melalui Prof. Dr. dr. Sofia Mubarika, serta dr. Yohanes Widodo Wirohadidjojo, Sp.KK(K) dan dr. Arief Budiyanto Ph.D. atas komentar dan masukannya.

KEPUSTAKAAN

1. Pathak MA, Nghiem P, dan Fitzpatrick TB. "Acute and chronic effects of the sun. In: IM Freedberg et al, editors Fitzpatrick's dermatology in general medicine, 5th ed. New York: McGraw-Hill, 1999: 1598-607.
2. F'guyer S, Afaq F and Mukhtar H. Photochemoprevention of skin cancer by botanical agents. *Photodermatol, photoimmunol & photomed*, 2003; 19: 56-72.
3. Ichihashi M, Ueda M, Nagano T, Kondoh M, Bito T, Ahmed NU et al. Skin photobiology. Dalam Kumpulan Makalah Kongres Nasional VIII Perdoski Yogyakarta. 1995: 575-86.
4. Jung EG and Bohnert E. Photobiology of ultraviolet radiation-induced DNA damaged. In: J. Krutmann, CA Elmetz, editors. *Photoimmunology*. Oxford: Blackwell Science. 1995: 34-41.
5. Kochevar IE. Primary process in photobiology and photosensitization. In: J Krutman dan CA Elmet, editors. *Photoimmunology*. Oxford: Blackwell Science, 1995: 19-33.
6. Duglosz AA and Yuspa SH. Carcinogenesis: Chemical. In: IM Freedberg *et al*, editors. *Fitzpatrick's dermatology in general medicine*, 5th ed. New York: McGraw-Hill, 1999: 452-64.
7. Jakubovic HR and Ackerman AB. Structure and function of skin: Development, morphology, and physiology. In: Moschella SL and Hurley HJ, editors. *Dermatol*. Philadelphia: W.B. Saunders Company, 1992: 3-87.
8. Freshney RI. Culture of animal cells: A manual of basic technique, 4th ed. New York: Wiley-Liss, 2000.
9. Cavanagh T. Where I can find out more about HeLa cells?." <http://www.madsci.org/posts/archives/may97/860431113.Cb.r.html>, diakses: 25 Februari 2003, 1997.
10. Baumann L. Antioxidants," dalam Wiesberg E, L. Baumann (eds.). *Cosmetics Dermatology: Principles and Practice*, The McGraw-Hill Companies, New York. 2002: 105-116.
11. Eady RAJ, Leigh IM and Pope FM. Anatomy and Organization of human Skin. In: RH Champion, Burton, JR. and Burns DA, editors. *Rook/Wilkinson/Ebling: Textbook of Dermatology*, 6th ed. New York: Blackwell Science Inc. 1997: 37-83.
12. <http://www-micro.msb.le.ac.uk/video/culture.html>, "Cell Culture," diakses 3 November 2003.
13. Eberlein-Konig B, Placzek M and Przybilla B. "Phototoxic Lysis of Erythrocytes from Humans is Reduced after Oral Intake of Ascorbic Acid and d-alpha-tocopherol," *Photodermatol Photoimmunol Photomed*, 1997; 13 (5-6): 173-77.
14. Puskas F, Gergely P, Banki K and Perl A. Stimulation of the Pentose Phosphate Pathway and Glutathione Levels by Dehydroascorbate, the Oxidized Form of Vitamin C. *FASEB*, 2000; 14: 1352-61.
15. Kenyon J. Are There Safer Ways of Killing Cancer Cells than Chemotherapy?," <http://www.health-report.co.uk/killing-cancer-cells-safely.htm>, diakses 24 Oktober 2004.
16. Goodman & Gillman. *Ascorbic Acid (Vitamin C)*, dalam Goodman & Gillman's (eds), *Pharmacological Basis of Therapeutics*, New York: McGraw-Hill, 1996: 1568-71.
17. Werninghaus KI. Role of Antioxidants in Reducing Photodamage. In: BA. Gilchrest, editor. *Photodamage*. Cambridge: Blackwell Science, 1995: 249-58.
18. Budiyanto A, Ueda M, Ueda T and Ichihashi M. Formation of Cyclobutane Pyrimidine Dimers and 8-Oxo-7,8-dihydro-2'-deoxyguanosine in Mouse and Organ-cultured Human Skin by Irradiation with Broadband or with Narrowband UVB", *Photochemistry and Photobiology*, 2002; 76 (4): 397-400.
19. Kielbassa C, Roza L and Epe B. Wavelength Dependence of Oxidative DNA Damage Induced by UV and Visible Light," *Carcinogenesis*, 1997; 18 (4): 811-16.
20. Kvam E and Tyrrell RM. Induction of Oxidative DNA Base Damage in Human Skin Cells by UV and Near Visible Radiation," *Carcinogenesis*, 1997; 18 (12): 2379-84.
21. Zhang W, Remenyik E, Zelterman D, Brash DE and Wikonkal NM. Escaping the Stem Cell Compartment: Sustained UVB Exposure Allows p53-mutant Keratinocytes to Clonize Adjacent Epidermal Proliferating Units without Incurring Additional Mutations," *PNAS*, 2001; 98 (24): 13948-53.
22. Stewart MS, Cameron GS and Pence BC. Antioxidant Nutrients Protects Against UVB-Induced Oxidative Damage to DNA of Mouse Keratinocytes in Culture. *J Invest Dermatol*, 1996; 106: 1086-89.
23. Wiyatno Y. *Fisika Modern*, Pustaka Pelajar, Yogyakarta, 2003.
24. Sakagami H, Satoh K, Hakeda Y dan Kumegawa. M. Apoptosis-inducing Activity of Vitamin C and Vitamin K. *Cell Mol Biol*, 2000; 46 (1): 129-43.
25. Vissers MCM, Lee W, and Hampton MB. Regulation of Apoptosis by Vitamin C: Specific Protection of the Apoptotic Machinery against Exposure to Chlorinated Oxidants. *J Biol Chem*. 2001; 276: 46835-40.
26. Savini I, Catani MV, Rossi A, Duranti G, Melino G and Avigliano L. Ascorbic Acid Maintenance in HaCaT Cells Prevents Radical Formation and Apoptosis by UVB. *Free Radic Biol Med*, 1999; 26: 1172-80.
27. Riordan NH, Riordan HD, Meng X, Li Y and Jackson. JA. Intravenous Ascorbate as a Tumor Cytotoxic

- Chemotherapeutic Agent." *Medical Hypotheses*. 1995; 44: 207-13.
28. Lim HW. Abnormal Responses to Ultraviolet Radiation: Photosensitivity Induced by Exogenous Agents," dalam I.M. Freedberg *et al.* (eds.), *Fitzpatrick's Dermatology in General Medicine*. 5th ed. New York: McGraw-Hill. 1999: 1589-98.
29. Meves A, Stock SN, Beyerle A, Pittelkow MR, and Peus D. Vitamin C Derivative Ascorbyl Palmitate Promotes Ultraviolet-B-Induced Lipid Peroxidation and Cytotoxicity in Keratinocytes," *The Journal of Investigative Dermatology*, 2002; 119(5): 1103-08.
30. Lutsenko EA, Cárcamo JM, and Golde DW. Vitamin C Prevents DNA Mutation Induced by Oxidative Stress. *J Biol Chem*. 2002; 277: 16895-99.
31. Igney FH and Krammer PH. Death and Anti-Death: Tumour Resistance To Apoptosis. *Nature*, 2002; 2: 277-86.