



Original Article

Pengaruh Pemberian Vitamin C terhadap Aktifitas Fagositosis Makrofag dan Kadar Vitamin C dalam Cairan Intraperitoneal Mencit *Balb/C* dengan Sepsis

Hendra Widjaja*, Ign Riwanto*, Edi Dharmana**

*Bagian/SMF Bedah, **Bagian Parasitologi dan Imonologi
Fakultas Kedokteran Universitas Diponegoro/RSUP Dr. Kariadi Semarang

Abstrak

Latar belakang : Sepsis masih menjadi permasalahan dalam praktek klinis karena angka mortalitas masih tinggi. Penelitian bertujuan mengetahui pengaruh dosis bertingkat vitamin C yang dibutuhkan untuk mencapai aktivitas fagositosis optimal makrofag mencit sepsis.

Metode : Penelitian ini merupakan uji laboratoris mencit *Balb/C* dengan pendekatan *the post test only controlled group design*, 20 ekor mencit sepsis dibagi 4 kelompok: kelompok kontrol (K); kelompok perlakuan mendapat vitamin C 0,52 mg/hari (P1); vitamin C 1,04 mg/hari (P2); vitamin C 2,6 mg /hari (P3) selama 3 hari, kemudian diperiksa kemampuan fagositosis makrofag dan kadar vitamin C intraperitoneal. Tingkat aktivitas fagositosis makrofag dan kadar vitamin C intraperitoneal dianalisis dengan ANOVA dilanjutkan dengan *Bonferroni test*, dan korelasi keduanya diuji dengan uji korelasi *Spearman*.

Hasil : Terdapat perbedaan bermakna pada kemampuan fagositosis makrofag dalam kelompok ($p < 0,05$). Uji antar kelompok menunjukkan: K-P1 ($p < 0,001$), K-P2 ($p < 0,001$), K-P3 ($p < 0,001$), P1-P2 ($p < 0,001$), P1-P3 ($p < 0,001$), tetapi tidak didapatkan perbedaan yang bermakna antara P2-P3 ($p = 0,48$). Terdapat perbedaan bermakna kadar vitamin C intraperitoneal K-P2 ($p < 0,001$), K-P3 ($p < 0,001$), P1-P2 ($p = 0,003$), P1-P3 ($p < 0,001$), P2-P3 ($p < 0,001$), kecuali pada kelompok K-P1 ($p = 0,131$). Didapatkan korelasi positif antara kadar vitamin C intraperitoneal dengan fagositosis makrofag ($r = 0,58$; $p < 0,001$).

Simpulan : Terdapat peningkatan signifikan pada fagositosis makrofag dan kadar vitamin C intraperitoneal pada mencit *Balb/C* dengan sepsis yang diberi vitamin C. Dosis ideal vitamin C adalah 1,04 mg/hari, dan kadarnya meningkat sesuai dosis yang diberikan.

Kata kunci: Sepsis, vitamin C, fagositosis makrofag, vitamin C intraperitoneal.

The Effect of Vitamin C Treatment to Intraperitoneal Macrophages Phagocytic Activity and Vitamin C Level on Septic *Balb/C* Mice

Abstract

Background : Sepsis in the hospitalized patients remains to be a major concern due to its high mortality. The aim of the study was to determine the effect of various level vitamin C doses needed to achieve optimum phagocytic activity of macrophages from septic mice.

Methods : This was animal experimental study with randomized post test only controlled group design. Samples were 20 septic *Balb/C* mice divided into 4 groups: control (K); and treatment group administered 0.52 mg intravenous vitamin C/day (P1); 1.04 mg vitamin C (P2); 2.6 mg vitamin C (P3). All groups were treated for 3 days, phagocytosis ability of macrophages and the level of intraperitoneal vitamin C were measured. ANOVA with Bonferroni Test was used to analyzed. Spearman's Correlation test was performed to analyze the correlation.

Results : Within group test showed significant difference in macrophage phagocytosis ability ($p < 0.001$). Between group test showed: K-P1 ($p < 0.001$), K-P2 ($p < 0.001$), K-P3 ($p < 0.001$), P1-P2 ($p < 0.001$), P1-P3 ($p < 0.01$). There were no significant difference between the P2-P3 ($p = 0.48$). Intraperitoneal vitamin C levels were significantly different between K-P2 ($p < 0.001$), K-P3 ($p < 0.001$), P1-P2 ($p = 0.003$), P1-P3 ($p < 0.001$), P2-P3 ($p < 0.001$), but there were no significant different between the K-P1 ($p = 0.131$). There was positive correlation between levels of intraperitoneal vitamin C and macrophage phagocytosis ($r = 0.58$; $p < 0.001$).

Conclusion : There was a significant increased on macrophages phagocytosis and intraperitoneal vitamin C level on *Balb/C* mice with septic given vitamin C. The ideal dose of vitamin C was 1.04 mg/day and its increased in related with dose given.

Keywords : Sepsis, vitamin C, macrophage phagocytosis, intraperitoneal vitamin C.

PENDAHULUAN

Sepsis merupakan suatu kondisi kerusakan sistem imun akibat infeksi. Hal ini masih menjadi masalah dalam praktek klinis karena patogenezisnya yang sangat kompleks dan pengobatannya yang sulit serta angka mortalitas yang tinggi meskipun selalu terjadi perkembangan antibiotik yang baru. Sepsis terjadi di beberapa negara dengan angka kejadian yang tinggi dan kejadiannya masih terus meningkat. Berdasarkan data epidemiologi di Amerika Utara bahwa sepsis terjadi pada 3 kasus dari 1000 populasi yang diartikan 750.000 penderita per tahun.¹ Angka mortalitas sepsis mencapai 30% dan bertambah pada usia tua 40% dan penderita sepsis dengan syok mencapai 50%.¹ Meskipun selalu terjadi perkembangan antibiotik dan terapi perawatan intensif, sepsis menimbulkan angka kematian yang tinggi di hampir semua ruang *Intensive Care Unit* (ICU). Sindrom sepsis mulai dari *Systemic Inflammatory Response Syndrome* (SIRS) sampai sepsis yang berat (disfungsi organ yang akut) dan syok sepsis (sepsis yang berat ditambah dengan hipotensi yang tak membaik dengan resusitasi cairan).^{2,3}

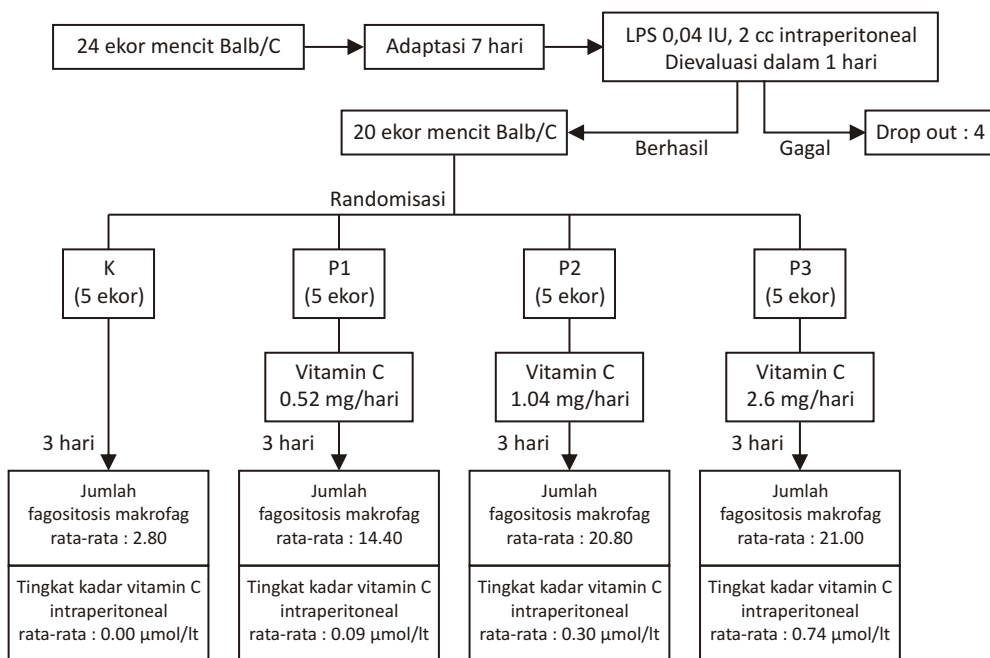
Mediator-mediator inflamasi atau sitokin diproduksi pada keadaan sepsis. Makrofag merupakan salah satu mediator seluler, makrofag memegang peranan penting dalam patogenesis syok septik. Penelitian terakhir menunjukkan bahwa LPS dapat menurunkan kemampuan IFN-gamma atau LPS untuk memacu *Inducible nitric oxide synthase* (iNOS) pada kultur makrofag sehingga NO mengalami penurunan.^{4,7} Selain

itu pada sepsis juga didapatkan kadar vitamin C dalam plasma yang menurun. Pemberian vitamin C akan meningkatkan konsentrasi dalam plasma dan jaringan sehingga menurunkan morbiditas.⁸⁻⁹ Penelitian ini menguji aktifitas fagositosis makrofag setelah diberi suntikan vitamin C, kadar vitamin C dalam cairan intraperitoneal dan kaitannya dengan fagositosis makrofag tersebut.

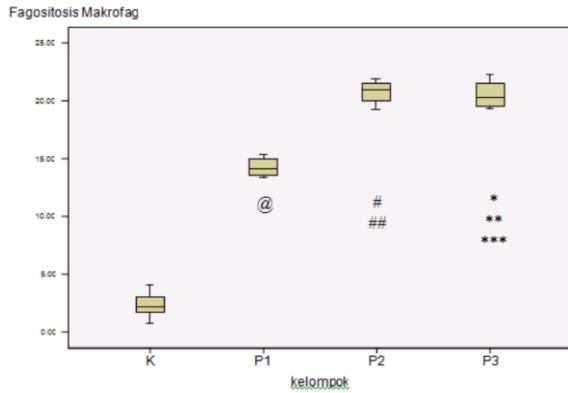
METODE

Penelitian ini merupakan uji laboratoris dengan menggunakan mencit *Balb/C* dan pendekatan *the post test only controlled group design*. Dua puluh ekor mencit sepsis dibagi 4 kelompok: kelompok kontrol (K); kelompok perlakuan mendapat vitamin C 0,52 mg/hari (P1); vitamin C 1,04 mg/hari (P2); vitamin C 2,6 mg/hari (P3). Dilakukan perlakuan selama 3 hari, kemudian diperiksa kemampuan fagositosis makrofag dan pengukuran kadar vitamin C intraperitoneal. Aktivitas fagositosis makrofag dinyatakan dengan jumlah makrofag yang memfagosit partikel latex dalam 200 makrofag yang diperiksa dengan mikroskop cahaya. Perhitungan kadar vitamin C intraperitoneal digunakan cairan intraperitoneal dan diukur dengan alat HPLC.

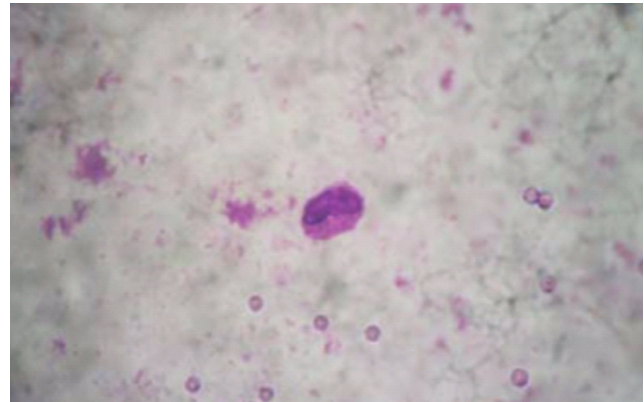
Analisis statistik tingkat aktivitas fagositosis makrofag dan kadar vitamin C intraperitoneal dengan menggunakan ANOVA dilanjutkan dengan Bonferroni test. Uji korelasi antara kadar vitamin C intraperitoneal dan tingkat aktifitas fagositosis makrofag dengan menggunakan uji korelasi *Spearman*.



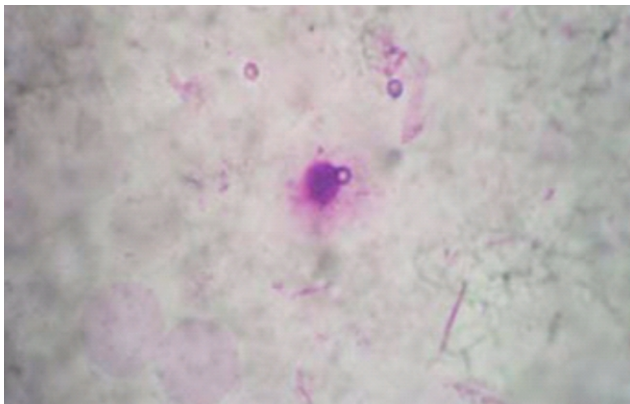
Gambar 1. Alur dan ringkasan penelitian



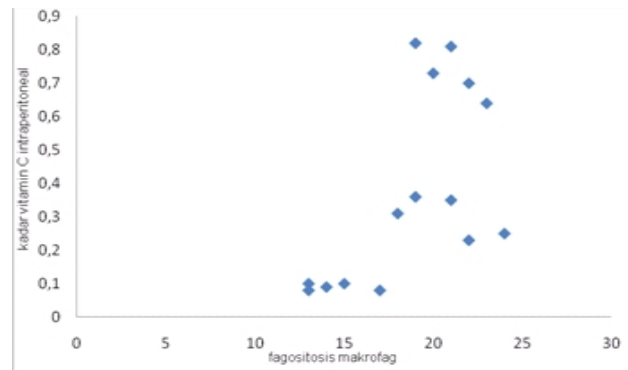
Gambar 2. Box plot fagositosis makrofag mencit: ANOVA, $p < 0,001$. Perbedaan antar kelompok *P3 dibanding K, $p < 0,001$, **P3 dibanding P1, $p < 0,001$, ***P3 dibanding P2, $p = 0,48$, #P2 dibanding K, $p < 0,001$, ##P2 dibanding P1, $p < 0,001$, @P1 dibanding K, $p < 0,001$



Gambar 3. Makrofag yang tidak memfagositosis Latex (Pembesaran 1000x)



Gambar 4. Makrofag yang memfagositosis Latex (Pembesaran 1000x)



Gambar 5. Scatterplot korelasi antara fagositosis makrofag dan kadar vitamin C intraperitoneal ($r = 0,58$; $p < 0,001$)

HASIL

Penelitian ini menggunakan 24 ekor mencit *Balb/C* dari keturunan murni berumur 8–10 minggu dan berat badan 20–40 gram yang telah diadaptasi selama 7 hari kemudian, lalu disuntikan LPS agar sepsis dan dipantau selama 1 hari. Setelah 1 hari terdapat 4 ekor mencit yang tidak menjadi sepsis dan masuk ke kriteria eksklusi. Kemudian dilakukan randomisasi dalam 4 kelompok yaitu kelompok kontrol (K) yang terdiri dari 5 ekor mencit yang diberikan perlakuan LPS *E. Coli* 0,04 IU sebanyak 2 cc intraperitoneal, 3 kelompok perlakuan, P1, P2 dan P3 diberikan LPS *E. Coli* sebanyak 2 cc intraperitoneal dan masing-masing diberikan vitamin C intravena 0,52 mg/hari, 1,04 mg/hari dan 2,6 mg/hari selama 3 hari. Setelah itu mencit dibunuh dan diambil cairan peritonealnya lalu dihitung jumlah fagositosis makrofag dan kadar vitamin C intraperitoneal pada tiap kelompok percobaan. Alur penelitian dan hasil secara lengkap dapat dilihat pada gambar 1.

Terdapat perbedaan bermakna antara aktivitas fagositosis makrofag pada kelompok K ($2,80 \pm 0,37$) dibandingkan dengan masing-masing kelompok perlakuan P1 ($14,40 \pm 0,68$), P2 ($20,80 \pm 0,66$) dan P3 ($21,00 \pm 0,58$) dengan nilai $p < 0,05$. Uji antar kelompok pada gambar 2 menunjukkan: K-P1 ($p < 0,001$), K-P2 ($p < 0,001$), K-P3 ($p < 0,001$), P1-P2 ($p < 0,001$), P1-P3 ($p < 0,001$), tetapi tidak didapatkan perbedaan yang bermakna antara P2-P3 ($p = 0,48$). Oleh karena itu dapat diartikan bahwa pemberian vitamin C secara bertingkat dengan dosis 0,52 mg/hari (P1) dan 1,04 mg/hari (P2) meningkatkan fagositosis makrofag yang cukup bermakna, tetapi bila dosis dinaikkan lagi menjadi 2,6 mg/hari (P3) menghasilkan peningkatan yang tidak bermakna dibandingkan P2 yang mendapat dosis 1,4 mg/hari ($p = 0,48$). Jadi meskipun secara keseluruhan peningkatan dosis vitamin C menghasilkan kenaikan fagositosis makrofag yang bermakna, tetapi pada batas dosis tertentu laju kenaikan fagositosis makrofag akan melambat.

Rata-rata tingkat kadar vitamin C intraperitoneal pada kelompok kontrol (K) adalah $0,00 \pm 0,00$, kelompok perlakuan 1 (P1) $0,09 \pm 0,45$, kelompok perlakuan 2 (P2) $0,30 \pm 0,11$, dan kelompok perlakuan 3 (P3) $0,74 \pm 0,14$. Terdapat perbedaan bermakna kadar vitamin C intraperitoneal K-P2 ($p < 0,001$), K-P3 ($p < 0,001$), P1-P2 ($p = 0,003$), P1-P3 ($p < 0,001$), P2-P3 ($p < 0,001$), kecuali pada kelompok K-P1 ($p = 0,131$).

Didapatkan korelasi positif antara kadar vitamin C intraperitoneal dengan fagositosis makrofag ($r = 0,58$; $p < 0,001$).

DISKUSI

Secara keseluruhan peningkatan dosis vitamin C menghasilkan kenaikan fagositosis makrofag yang bermakna, tetapi pada batas dosis tertentu laju kenaikan fagositosis makrofag akan melambat. Berbagai penelitian melaporkan vitamin C mampu meningkatkan respon imun tubuh. Sitokin aktifator makrofag yang poten adalah IFN- γ . Proses *killing* terhadap bakteri menyangkut proses fagositosis dan pembentukan *Reactive Oxygen Species* (ROS). Sitokin seperti IFN- γ akan meningkatkan baik endositosis maupun fagositosis oleh monosit. Fagositosis terhadap partikel bakteri dapat ditingkatkan dengan molekul IgG atau komplemen. Setelah bakteri masuk ke dalam fagolisosom sel maka makrofag akan membunuh dengan pembentukan *Reactive Oxygen Species* (ROS) melalui jalur *Reactive Oxygen Intermediates* (ROI). Proses *killing* terhadap bakteri dibedakan menjadi 2 yaitu untuk bakteri ekstraseluler dan intraseluler. Pada bakteri ekstraseluler, setelah dicerna didalam fagolisosom dengan menggunakan ROS termasuk NO, maka makrofag ini akan memproses antigen bakteri tersebut dan mengekspresikannya ke permukaan sel makrofag bersama dengan MHC II, yang selanjutnya akan dikenali oleh sel T-Helper CD4 yang akan mensekresikan IFN- γ , IFN- γ ini akan mengaktifasi proses pencernaan dalam fagolisosom makrofag. Sedangkan pada bakteri intraseluler, setelah masuk ke dalam fagolisosom bakteri ini akan masuk ke sitoplasma makrofag dan *survive* didalam APC tersebut. Bakteri akan mempengaruhi sel host untuk mensintesa protein-protein tertentu, yang merupakan antigen yang akan dipresentasikan ke permukaan makrofag bersama MHC I, MHC I ini akan dikenali oleh CD8 yang selanjutnya akan dilakukan proses *killing*.⁵

Penurunan kadar vitamin C dalam cairan intraperitoneal dibandingkan dengan pemberian intravena akan terjadi pada kondisi sepsis. Hal ini

dibuktikan dengan menurunnya kadar vitamin C intraperitoneal setelah diberikan dosis vitamin C bertingkat. Asam askorbat diangkut ke dalam sel oleh *Specific sodium-dependent Vitamin C Transporter 1* (SVCT1) dan *Specific sodium-dependent Vitamin C Transporter 2* (SVCT2) yang merupakan pengangkut vitamin C yang tergantung natrium. SVCT1 dan SVCT2 ditemukan hampir disemua jaringan termasuk intraperitoneal. Asam dehidroaskorbat diangkut oleh pengangkut glukosa *Glucose Transporters* (GLUT1), GLUT3, dan di dalam jaringan yang sensitif terhadap insulin oleh GLUT4.⁹

Pemberian dosis vitamin C dengan dosis bertingkat akan menyebabkan kenaikan kadar vitamin C intraperitoneal. Tingkat kadar vitamin C intraperitoneal memiliki korelasi positif terhadap tingkat aktifitas fagositosis makrofag.

SIMPULAN

Terdapat peningkatan signifikan pada fagositosis makrofag mencit *Balb/C* dengan sepsis yang diberi vitamin C, dosis ideal adalah 1,04 mg/hari dan peningkatan yang signifikan tingkat kadar vitamin C intraperitoneal sesuai dengan dosis yang diberikan. Kadar vitamin C intraperitoneal memiliki korelasi positif dengan aktifitas fagositosis makrofag.

DAFTAR PUSTAKA

1. Cohen J. The immunopathogenesis of sepsis. Brighton, England. Nature Publishing Group, 2002:885-892
2. Marshall JS. Sepsis: rethinking the approach to clinical research. PubMed:18171697, J. Leukoc. Biol. 2008;83:471-482
3. Dellinger RP, Levy MM, Carlet JM, Bion J. International surviving sepsis campaign guideline committee: international guidelines for management of severe sepsis and shock. Intensive Care Med. 2008;36:296-327
4. Abbas AK. Cellular and molecular immunology. 5th ed. Philadelphia: Elsevier Saunders Companies, 2007;6:23,65-103,175-185,258-259.
5. Paterson RL, Webster NR. Sepsis and the systemic inflammatory response syndrome. Aberdeen, U.K. Educational Review. 2000:178-82.
6. Hotchkiss SR, Karl EI. The pathophysiology and treatment of sepsis. Pierre Benite. Advances in Sepsis. 2003:338-50.
7. Wright G, Singh IS, Hasday JD, Farrancel IK, Hall G, Cross AS and Rogers TB. Endotoxin stress-responsse in cardiomyocytes: NF-B activation and tumor necrosis factor- expression. Am J Physiol Heart Circ Physiol, 2002;282:872-879
8. Adam S. The antioxidant vitamins. Available from: : <http://www.i2k.-suzanne/vitaminandc.htm#c>. Accessed January 26, 2010
9. Karl IE. Pathogenesis of sepsis and multiorgan dysfunction. J Cell Biochem, 1992;267:1931-1944