

## Uji Efek Antiinflamasi Kombinasi Astaxanthin dan Vitamin A terhadap Jumlah Neutrofil dan Limfosit pada Tikus Putih Galur Wistar yang diinduksi Karagenin

Syarifi<sup>1</sup>, M. In'am Ilmiawan<sup>2</sup>, Pandu Indra Bangsawan<sup>3</sup>

<sup>1</sup> Program Studi Pendidikan Dokter, FK UNTAN

<sup>2</sup> Departemen Biologi dan Patobiologi Medik, Program Studi Pendidikan Dokter, FK UNTAN

<sup>3</sup> Departemen Farmakologi, Program Studi Pendidikan Dokter, FK UNTAN

### Abstrak

**Latar Belakang.** Inflamasi adalah respon protektif yang ditujukan untuk menghilangkan penyebab jejas awal sel dan jaringan nekrotik yang diakibatkan oleh kerusakan sel. Astaxanthin adalah antioksidan yang merupakan salah satu kelompok pigmen natural dari karotenoid.. Astaxanthin juga berefek sebagai antiinflamasi. Vitamin A merupakan memiliki efek antioksidan dan diketahui dapat berfungsi sebagai antiinflamasi. Kombinasi astaxanthin dan vitamin A diharapkan dapat meningkatkan efek antiinflamasi. **Metode.** Desain penelitian ini merupakan *true experimental* dengan *complete randomized design*. Dalam Penelitian ini digunakan sebanyak 30 tikus dan dibagi menjadi 5 kelompok. Analisa data menggunakan SPSS versi 16.0. dengan *One Way ANOVA* dilanjutkan *Post Hoc Test LSD*. **Hasil.** Kombinasi astaxanthin dan vitamin A pada kelompok 4 menurunkan jumlah neutrofil yang berbeda bermakna ( $P= 0,01$ ) dibandingkan dengan kelompok kontrol negative pada jam ke-4. Kelompok 5 berbeda bermakna pada jam ke-4 ( $P= 0,004$ ) dan jam ke-8  $p=0,023$ . **Kesimpulan.** Kombinasi astaxanthin dan vitamin A dapat berperan sebagai agen antiinflamasi dengan dosis astaxanthin 2,88 mg/KgBB dan vitamin A 0,45 mg/kgBB

**Kata Kunci:** Inflamasi, astaxanthin, vitamin A, neutrofil, limfosit

**Background.** *Inflammation is a protective response aimed to eliminate the cause of the initial injury on cells and necrotic tissue caused by cells damage. Astaxanthin is an antioxidant which is one of the natural pigments of carotenoid group. Astaxanthin also has an anti-inflammatory effect. Vitamin A has an antioxidant effects that can function as an anti-inflammatory. The combination of astaxanthin and vitamin A is expected to enhance the anti-inflammatory effects.* **Method.** *This is a true experimental study with complete randomized design. This study used 30 mice which were divided into 5 groups. The data was analyzed using SPSS 16.0 with One Way ANOVA test followed by Post Hoc Test LSD.* **Results.** *The combination of astaxanthin and vitamin A on group 4 lower the number of neutrophils that is significantly different ( $P = 0.01$ ) compared to the negative control group on the 4<sup>th</sup> hour. The 5<sup>th</sup> group is significantly different on the 4<sup>th</sup> hour ( $P = 0.004$ ) and 8<sup>th</sup> hours  $p = 0.023$ ).* **Conclusion.** *The combination of astaxanthin and vitamin A can act as an anti-inflammatory agent with astaxanthin dose of 2.88 mg/ kgBW and vitamin A dose of 0.45 mg / kgBW.*

**Keywords:** *Inflammation, astaxanthin, vitamin A, neutrophils, lymphocytes*

## PENDAHULUAN

Inflamasi adalah respon protektif yang ditimbulkan oleh cedera atau kerusakan jaringan yang berfungsi menghancurkan atau mengurangi atau mengurung (sekuester) baik agen pencedera maupun jaringan yang cedera. Inflamasi juga merupakan suatu respon protektif yang ditujukan untuk menghilangkan penyebab awal jejas serta membuang sel dan jaringan nekrotik yang diakibatkan oleh kerusakan sel.

1;2

Jejas atau trauma dapat memicu terjadinya inflamasi. Inflamasi yang terjadi menyebabkan kedatangan sel-sel leukosit seperti neutrofil dan limfosit. Neutrofil memiliki peran dalam respon inflamasi akut yang nantinya akan

memfagosit bakteri sedangkan limfosit pada inflamasi kronik akan menghasilkan imunitas humoral dan kemudian menghancurkan sel sasaran dengan mengeluarkan berbagai zat kimia.<sup>2,3</sup>

Obat antiinflamasi yang paling banyak digunakan adalah obat antiinflamasi non-steroid (OAINS). Penggunaan obat OAINS dihindari pada pasien dengan riwayat gastritis atau ulkus peptikum dan hemofilia. Penggunaan OAINS yang menghambat siklooksigenase (COX) tidak bisa digunakan dalam jangka waktu lama karena dapat menyebabkan terjadinya ulkus peptikum, nefropati analgetik, menghambat fungsi platelet, menghambat induksi

persalinan serta meningkatkan insiden hipertensi.<sup>7,8</sup>

Penelitian yang dilakukan oleh Lee *et al* pada tahun 2003 didapatkan Astaxanthin selain sebagai antioksidan juga memiliki efek antiinflamasi dengan cara menghambat produksi mediator inflamasi melalui memblok jalur aktivasi *Nuclear Factor-k $\beta$*  (NF-k $\beta$ ). Penelitian lain juga dilakukan oleh Bangsawan pada tahun 2012 didapatkan hasil bahwa astaxanthin memiliki efek antiinflamasi melalui jalur NF-k $\beta$  yang ditandai dengan penurunan kadar neutrofil dan limfosit.<sup>9,10</sup>

Vitamin A merupakan antioksidan yang larut dalam lemak. Vitamin A meningkatkan daya tahan tubuh terhadap

peyakit infeksi seperti campak, dan infeksi saluran pernafasan akut (ISPA). Penelitian yang dilakukan oleh Reifen pada tahun 2002 didapatkan bahwa vitamin A mempunyai peran sebagai antiinflamasi. Studi pada tikus yang dibuat mengalami defisiensi vitamin A akan meningkatkan respon sitokin proinflamasi.<sup>11,12,13</sup>

Penelitian-penelitian yang telah menyatakan efek astaxanthin dan vitamin A sebagai efek antiinflamasi mendorong peneliti untuk mengetahui efek antiinflamasi yang menggunakan kombinasi astaxanthin dan vitamin A sebagai obat antiinflamasi. Penelitian ini menggunakan dosis astaxanthin bervariasi dan dosis vitamin A yang tetap untuk

melihat apakah meningkatkan efek antiinflamasi atau malah menurunkan efek anti inflamasi.

## **METODE**

### **Bahan**

1. Instrumen yang digunakan adalah:

Instrumen yang digunakan pada penelitian ini adalah kandang tikus, timbangan hewan, timbangan analitik, spuit disposable 1 ml dan 5 ml, sarung tangan kulit, sonde lambung, gelas ukur, mortir dan penggerus, spuit injeksi, stopwatch, kaca objek, kaca penutup, mikroskop cahaya dan kamera.

2. Bahan yang digunakan adalah:

Bahan yang digunakan pada penelitian ini adalah astaxanthin tablet dengan mutu farmasetik dengan *Certificate of analysis* dari PT Futamed, vitamin C tablet, celecoxib tablet, aquadest, pakan pellet hewan, alkohol absolut, karagenin, NaCl, CMC, metil alcohol, larutan giemsa, buffer dengan pH 6,4.

### **Hewan Uji**

Tikus yang digunakan dalam penelitian adalah tikus putih (*Rattus novergicus*) jantan galur wistar. Sampel tikus yang digunakan sebanyak 30 ekor dengan umur 8-12 minggu dengan berat badan 180-200 gram. Sampel di aklimatisasi dengan lingkungan laboratorium

selama 7 hari dan dibagi secara acak menjadi 5 kelompok. Pemberian makanan adalah pakan standar dan minum *ad libitum*.

### **Prosedur Penelitian**

Perlakuan yang diberikan pada penelitian ini adalah pemberian astaxanthin dengan dosis bertingkat yaitu: 0,72 mg/kgBB, 1,44 mg/kgBB, 2,88 mg/kgBB yang masing-masing dikombinasikan dengan vitamin A dalam dosis tetap yaitu 0,45 mg/kgBB. Pemberian obat (kombinasi astaxanthin dan vitamin A) dilakukan secara peroral dengan menggunakan sonde lambung. Obat hanya diberikan 1 kali selama penelitian. Karagenin disuntikkan pada subplantar hewan coba setelah 1 jam

pemberian obat peroral. Setelah itu, dilakukan pengambilan darah melalui bagian ujung ekor tikus pada jam ke-0, 4, 8 dan 12 setelah injeksi karagenin. Sampel darah yang diambil langsung dibuat sediaan apusan darah tepi dan diwarnai dengan pewarnaan giemsa. Sediaan apus darah tepi yang telah dibuat diamati menggunakan mikroskop dengan perbesaran 100x untuk melihat hitung jenis neutrofil dan limfosit per 100 sel. Data yang diperoleh dianalisis secara statistik menggunakan *shapiro wilk*, *levene test*, *kruskall-wallis* dan *mann-whitney*.

### **HASIL**

Perlakuan pada penelitian ini adalah pemberian kombinasi

Astaxanthin dalam dosis bervariasi (0,72 mg/kgBB, 1,44 mg/kgBB dan 2,88 mg/kgBB) dan Vitamin A dalam dosis tetap yaitu 0,45 mg/kgBB. Satu jam kemudian disuntikan karagenin pada subplantar kaki tikus, kemudian dilakukan pengambilan sampel darah melalui ekor tikus sebanyak 1 tetes yang diletakkan di kaca objek untuk dibuat apusan darah tepi kemudian diwarnai dengan pewarnaan giemsa. Darah tikus diambil setiap 4 jam sekali yaitu jam ke 0,4,8,12. Apusan darah tepi yang telah diwarnai kemudian diamati menggunakan mikroskop cahaya dengan perbesaran 100x untuk menghitung jumlah neutrofil dan limfosit. Proses penghitungan dilakukan sebanyak 10 lapang

pandang dan menghitung sebanyak 100 sel dengan metode zigzag.

Rerata hitung jenis neutrofil dan limfosit pada jam ke-0 memiliki perbedaan bermakna ( $P < 0,05$ ) antara kontrol negatif dengan perlakuan 1, perlakuan 2 dan perlakuan 3. Meskipun demikian hal ini belum membuktikan efek antiinflamasi karena pada jam ke-0 belum terjadi proses inflamasi. Pada jam ke-4 rereta hitung jenis neutrofil memiliki perbedaan bermakna antara kontrol negatif dengan kontrol positif, perlakuan 2 dan perlakuan 3.

Meskipun dengan perlakuan 1 tidak memiliki perbedaan bermakna tetapi nilai rerata neutrofil pada perlakuan 1 jam ke-4 masih dalam rentang normal. Sedangkan hitung jenis limfosit pada jam ke-4 memiliki perbedaan bermakna antara kontrol

negatif dengan kontrol positif, perlakuan 1, perlakuan 2 dan perlakuan 3. Pada jam ke-8 rerata hitung jenis neutrofil memiliki perbedaan bermakna antara kontrol negatif dengan kontrol positif dan perlakuan 3. Sedangkan dengan perlakuan 1 dan perlakuan 2 tidak memiliki perbedaan bermakna. Hal ini membuktikan bahwa perlakuan 1 dan perlakuan 2 tidak dapat menekan inflamasi sehingga rerata hitung jenis neutrofil pada jam ke-8 masih menandakan terjadinya inflamasi. Sedangkan perlakuan 3 sangat baik dalam menekan inflamasi.

## PEMBAHASAN

Berdasarkan hasil yang didapatkan pada jam ke-0 dan jam ke-4 pada kontrol negatif menunjukkan bahwa pada jam ke-4 terjadi peningkatan rerata hitung

jenis neutrofil secara signifikan ini menandakan bahwa telah terjadi inflamasi yang diinduksi karagenin 0,1% pada subplantar kaki tikus. Kontrol negatif Pada jam ke-8 inflamasi berangsur turun dan jam ke 12 inflamasi menghilang.

Adanya peningkatan hitung jenis neutrofil pada kontrol negatif dikarenakan telah terjadi inflamasi pada tikus. Terjadi respon inflamasi akut.

Karagenin mampu memicu inflamasi dikarenakan zat ini dapat menginduksi terjadinya inflamasi sebagaimana yang dilaporkan oleh Hassanein, Nahed M.A *et al* pada tahun 2008 dan Oliveira C *et al* pada tahun 2010 dimana dalam penelitiannya menggunakan karagenin untuk menginduksi inflamasi pada tikus yang akhirnya menyebabkan edema. Mediator yang

berperan seperti TNF- $\alpha$  dan IL-1 $\beta$  yang nantinya akan mengaktivasi neutrofil. Edema yang terjadi akibat terlepasnya mediator inflamasi seperti: histamin, serotonin, bradikinin, dan prostaglandin. TNF- $\alpha$  dan IL-1 $\beta$  yang berperan dalam menginduksi agregasi dan aktivasi neutrofil, produksi asam arakidonat dan NO. Selain itu TNF- $\alpha$  dan IL-1 memiliki hubungan timbal balik dengan NF-kB sehingga akan saling mengaktivasi.<sup>14-18</sup>

Celecoxib mampu menekan inflamasi dilihat pada jam ke-4 dan jam ke-8 terjadi penurunan rerata hitung jenis neurofil dan memiliki perbedaan bermakna jika dibandingkan dengan kontrol negatif. Obat ini memiliki efek antiinflamasi dikarenakan mampu menghambat biosintesis prostaglandin dengan

mekanisme utama melalui penghambatan selektif COX-2.<sup>7,19</sup>

Perlakuan pada jam ke-0 memiliki perbedaan bermakna jika dibandingkan dengan kontrol positif maupun kontrol negatif hal ini mungkin dikarenakan pada pengerjaan pengambilan darah tikus waktu yang tidak tepat jam ke-0 atau tidak bersamaan sehingga hitung jenis neutrofil lebih rendah jika dibandingkan dengan kelompok kontrol positif maupun kontrol negatif.

Astaxanthin memiliki peran antiinflamasi dengan cara menghambat produksi mediator inflamasi melalui jalur penekanan terhadap NF-kB sehingga menghambat produksi ROS yang kemudian menghambat produksi sitokin proinflamasi. Hal ini sesuai dengan yang dilaporkan oleh Lee

dalam penelitannya bahwa astaxanthin menghambat produksi mediator inflamasi melalui jalur NF-kB, penelitian lain oleh Speranza didapatkan bahwa astaxathin menghambat produksi ROS yang diinduksi oleh faktor transkripsi TNF-kB, yang kemudian menghambat produksi sitokin inflamasi.<sup>9,20</sup>

NF-K $\beta$  juga merangsang ekspresi enzim yang berkontribusi pada patogenesis proses inflamasi yang menghasilkan nitrit oxide (NO) dan menginduksi siklooksigenase (COX-2) yang menghasilkan prostanoids. Penekanan jalur NF-k $\beta$  akan menghambat produksi NO dan COX-2. Penekanan TNF- $\alpha$  dan IL-1 juga menghambat produksi NO. TNF- $\alpha$  dan IL-1 merupakan sitokin proinflamasi yang menyebabkan agregasi dan aktivasi neutrofil serta

menginduksi pelepasan neutrofil ke dalam sirkulasi.<sup>2,21</sup> Produksi sel darah putih di sum-sum tulang dapat ditingkatkan oleh adanya sitokin proinflamasi seperti IL-1 dan TNF dan disertai peningkatan neutrofil yang relatif imatur dalam darah (*neutrofil shift to the left*).<sup>2,5-6,14,21-22,24-25</sup>

Penelitian yang dilakukan oleh Bangsawan pada tahun 2012 dan beberapa penelitian lainnya dimana tikus diinduksi inflamasi dengan karagenin didapatkan hasil bahwa astaxanthin menghambat inflamasi dengan menurunkan jumlah neutrofil.<sup>9,10,14,20,22</sup>

Vitamin A dapat berefek antiinflamasi. Penelitian yang dilakukan oleh Xu *and* Drew (2006), yaitu dimana tikus dibuat mengalami multipel sklerosis hasilnya didapatkan bahwa *retinoid acid*

menghambat produksi NO yang diproduksi oleh mikroglia dan astrosit. *Retinoid acid* menghambat mikroglia untuk memproduksi sitokin proinflamasi TNF- $\alpha$  dan IL-1 $\beta$ . Selain itu *Retinoid acid* menghambat astrosit untuk memproduksi NO dan TNF- $\alpha$ . Dari Penelitian ini dapat diketahui bahwa vitamin A memberikan efek antiinflamasi dengan cara menekan sitokin inflamasi seperti IL-1 dan TNF  $\alpha$  sehingga menekan jumlah neutrofil.<sup>23</sup>

Efek antiinflamasi vitamin A sesuai dengan penelitian yang telah dilakukan oleh Gill *et al* pada tahun 2013 tikus yang diiduksi karagenin didapatkan bahwa *all trans retinoid acid* memberikan efek antiinflamasi yang ditandai dengan penurunan ROS dengan menurunnya kadar MDA. Vitamin A berperan sebagai

antiinflamasi dengan menekan sitokin proinflamasi seperti TNF  $\alpha$ , IL-1 yang dapat meningkatkan jumlah neutrofil pada proses peradangan.<sup>4,23</sup>

Perlakuan 3 dengan dosis Astaxanthin 2,88 dan vitamin A 0,45 mg/kgBB dapat menekan produksi neutrofil tampak sebagai rerata hitung jenis neutrofil dalam batas normal pada jam ke-4. Hal ini mungkin karenan dosis astaxanthin pada perlakuan 3 lebih tinggi jika dibandingkan dengan perlakuan 1 dan perlakuan 2. Sehingga memberikan efek yang lebih baik dalam menekan inflamasi.

## KESIMPULAN

Kombinasi astaxanthin dan vitamin A dapat berperan sebagai agen antiinflamasi dengan dosis astaxanthin 2,88 mg/KgBB dan vitamin A 0,45 mg/kgBB.

#### DAFTAR PUSTAKA

- Dorland, W. A. Newman. Kamus Kedokteran Dorland. Ed. 31 Jakarta: EGC. 2010
- Kumar, V et al., Buku Ajar Patologi Edisi 7 jilid 1. Jakarta : EGC. 2007. p.35
- Sherwood, L. Fisiologi Manusia : Dari Sel Ke Sistem. Jakarta : EGC.2006. p: 428-43
- Gill, N., Bijjem, K.R.V., Sharma, P.L. Anti-Inflammatory and Anti-Hiperalgic effect of all-trans retinoic acid in carrageenan-Induced paw edema in Wistar rat : Involment of peroxisome proliferator-Activated receptor-  $\beta/\delta$  receptors. *Indian J Pharmacol.* 45 (3). 2013. p: 278-82.
- Krisztina, Futosi., Szabina Fodor, Attila Mocsai., Neutrophil cell surface receptors and their intrasellular signal transduction pathways. 2013. 17(3): 638-50
- Klebanoff S.J et al. Stimulation of neutrophils by tumor necrosis factor. *J Immunol.* 1986.136:4220-25
- Goodman and Gilman's. The pharmacological Basis of therapeutic Agents; Analgesic Antipyretic Agents; L.L. Brunton, Ph. D.; 2008.
- Katzung, B. G. Farmakologi Dasar dan Klinik edisi 10. Jakarta : EGC. 2010.p:589-92
- Lee, S et al. Astaxanthin Inhibit Nitric Oxide Production and Inflammatory Gene Expression by Suppressing I $\kappa$ B Kinase-dependent NF- $\kappa$ B Activation. *Mol. Cell.* 2003. p : 97-105
- Bangsawan, P. I. Efek antiinflamasi Astaxanthin terhadap volume edema dan ekspresi cox-2 dengan penggunaan parameter limfosit dan neutrofil pada tikus putih dewasa galur wistar. Universitas Sriwijaya. Fakultas Kedokteran. Palembang, 2012. (Tesis).
- Reifen, R. Vitamin A as an Antiinflammatory agent. *Proceeding of the Nutrition Society.* 2002. p:397-400.
- Cox et al.,. Vitamin A supplementation increases ratios of proinflammatory to anti-inflammatory cytokine responses in pregnancy and lactation. *Clinical and Experimental Immunology*, 144. 2006.p: 392-400
- Almatsier, S. Prinsip Dasar Ilmu Gizi. Jakarta : Penerbit PT Gramedia Pustaka Utama. Dalam Wiwinda Rosita: Gambaran Faktor yang Mempengaruhi Pengetahuan Ibu yang memiliki Balita Tentang Vitamin A di Desa Lambaro Neujid Kecamatan Peukan Bada Kabupaten Aceh besar tahun 2013. [skripsi]
- Yamamoto and Gaynor. Therapeutic Potential of Inhibition of the NF- $\kappa$ B Pathway in the Treatment of Inflammation and Cancer. *J. Clin Invest.* 107 (2). 2001.p : 135- 42.
- Hassanein, Nahed M.A. et al.,. Roles of Interleukin-1 $\beta$  (IL-1 $\beta$ ) and Nitric Oxide (NO) in the Anti-Inflammatory Dynamics of Acetylsalicylic Acid Against Carrageenan Induced Paw Oedema in Mice. *Global Journal of Pharmacology* 2 2008.(1):11-9
- Oliveira C, et al.,. Effect of Plant Neutrofil elastase inhibitor on leucocyte migration, adhesion dan cytokine release in inflammatory conditions. *British Journal Pharmacology.* 2010 161. 899-910
- Hoesel, B., Schmid, J. A. The complexity of NF- $\kappa$ B signaling in inflammation and cancer. *Molecular Cancer.* 12:80. 2013 p.1-15.
- Necas and Bartosikova. Carrageenan: a review. *Veterinarni Medicina*, 58 (4). 2013.p:187-205
- Gunawan dan Sulistia., Farmakologi dan Terapi. Jakarta: FKUI. 2011.p: 231-33. 779-82.
- Speranza, L et al. Astaxanthin Treatment reduced Oxidative Induced

- Pro-Inflammatory Cytokines Secret in U937 :SHP-1 as a Novel Biological Target. *J Marine Drugs*. 2012. 10, 890-99;
21. Underwood, J.C.E General and Systematic pathology. 4<sup>ed</sup>. Elsevier. . 2007. p.201-219.
  22. Messina, S et al. Activation of Nf-k $\beta$  pathway in Duchenne muscular dystrophy: relation to age. *Acta myologica*. 30. 2011.p.16-23.
  23. Xu, J., Drew, P.D. 9-Cis retinoid acid suppresses inflammatory responses of microglia and astrocytes. *J. Neuroimmunol*. 171 (1-2), 2006. p: 135-44.
  24. Gamble J.R, et al. Stimulation of the adherence of neutrophil to umbilical vein endothelium by human recombinant tumor necrosis factor. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1985. 82: 8667-71
  25. Shalaby M.R. et al. Activation of human polymorphonuclear neutrophil function by interferon- $\gamma$  and tumor necrosis factor. *J Immunol*. 1985.135:2069-73