

## Penurunan Kadar Pro-adrenomedullin Mencit Balb/C Model Sepsis dengan Kortikosteroid Dosis Rendah

Diding Heri Prasteyo,<sup>1,2</sup> Ida Nurwati,<sup>1</sup> Yoseph Indrayanto,<sup>3</sup> A. Guntur Hermawan<sup>4</sup>

<sup>1</sup>Laboratorium Biokimia Fakultas Kedokteran Universitas Sebelas Maret Surakarta, <sup>2</sup>Divisi Imunologi Laboratorium Biokimia Fakultas Kedokteran Universitas Sebelas Maret Surakarta, <sup>3</sup>Laboratorium Biologi, Fakultas Kedokteran Universitas Sebelas Maret Surakarta, <sup>4</sup>Divisi Penyakit Tropik dan Infeksi Ilmu Penyakit Dalam Fakultas Kedokteran Universitas Sebelas Maret Surakarta/Rumah Sakit Dr. Moewardi Surakarta

### Abstrak

Penggunaan kortikosteroid dosis rendah pada penatalaksanaan sepsis tahap awal masih diperdebatkan. Pemberian kortikosteroid dosis rendah pada sepsis dapat mengurangi respons inflamasi sistemik, menghambat produksi sitokin proinflamasi dan mediator inflamasi, serta menurunkan adhesi leukosit ke endotel. *Pro-adrenomedullin* (pro-ADM) merupakan biomarker keparahan sepsis. Penelitian ini bertujuan untuk menganalisis efek penggunaan kortikosteroid dosis rendah pada kadar pro-ADM serum pada mencit Balb/C model sepsis tahap awal. Penelitian ini merupakan penelitian eksperimental laboratoris, dengan sampel 30 ekor mencit Balb/C jantan yang dibagi menjadi kelompok kontrol, sepsis, dan sepsis+kortikosteroid dosis rendah. Penelitian dilakukan di Laboratorium Histologi dan Biomedik, Fakultas Kedokteran, Universitas Sebelas Maret Surakarta, selama periode April–September 2012. Untuk membuat model sepsis, hewan coba diinokulasi lipopolisakarisa/LPS (*E. coli*) dosis 0,1 mg/mencit secara intraperitoneal (i.p). Kelompok tikus kontrol tidak diinokulasi selama penelitian. Kortikosteroid dosis rendah yang digunakan adalah metil prednisolon dosis 0,05 mg/mencit/12 jam secara i.p. Mencit kontrol tidak diinokulasi selama penelitian. Kadar pro-ADM serum ditentukan menggunakan *enzyme-linked immunosorbent assay* (ELISA). Uji kadar pro-ADM serum menggunakan *analysis of variance* (ANOVA) dan untuk menentukan perbedaan kemaknaan digunakan  $p < 0,05$ . Kortikosteroid dosis rendah secara bermakna menurunkan kadar pro-ADM dibandingkan dengan kelompok sepsis ( $33,0 \pm 2,9$  pg/mL vs  $48,5 \pm 6,1$  pg/mL;  $p < 0,001$ ). Simpulan, penggunaan kortikosteroid dosis rendah menurunkan kadar pro-ADM pada hewan coba model sepsis tahap awal. [MKB. 2014;46(2):68–72]

**Kata kunci:** Kortikosteroid dosis rendah, *pro-adrenomedullin*, sepsis

## Pro-adrenomedullin Level Reduction in Balb/C Sepsis Model Mice through the Use of Low-Dose Corticosteroid

### Abstract

The use of low-dose corticosteroids in the management of early stage of sepsis is still debated. Low-dose corticosteroids in sepsis can reduce the systemic inflammatory response, inhibit the production of pro-inflammatory cytokine, inflammatory mediators, and decrease adhesion of leukocytes to the endothelium. Pro-adrenomedullin (pro-ADM) is a biomarker of sepsis severity. This study aimed to analyze the effects of the use of low-dose corticosteroids on the levels of pro-ADM in the serum in Balb/C mice model of sepsis at the early stage. This study was an experimental research laboratory, with 30 male Balb/C mice which were divided into control, sepsis, and sepsis+low-dose corticosteroids groups. The study was conducted at the Histology and Biomedical Laboratory, Faculty of Medicine, Sebelas Maret University, Surakarta, during the period of April to September 2012. Sepsis was induced in the male Balb/C mice by inoculation through an intraperitoneally (i.p) injection of lipopolysaccharide/LPS (*E. coli*) with 0.1 mg/mice/i.p. dose for sepsis mice model. Control mice were not inoculated during the study. Low-dose corticosteroids used was methyl prednisolone at a dose of 0.05 mg/mice/12 hours/i.p. Pro-ADM serum level was measured with enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). One way analysis of variance (ANOVA) for pro-ADM serum level and  $p < 0.05$  were used to determine the significant differences. Low-dose corticosteroids significantly decreased pro-ADM level ( $33.0 \pm 2.9$  pg/mL vs  $48.5 \pm 6.1$  pg/mL,  $p < 0.001$ ) compared to the sepsis group. In conclusion, the use of low-dose corticosteroids reduce levels of pro-ADM in the early stages of sepsis. [MKB. 2014;46(2):68–72]

**Key words:** Low-dose corticosteroids, pro-adrenomedullin, sepsis

---

**Korespondensi:** Diding Heri Prasteyo, dr., MSi, Laboratorium Biokimia Fakultas Kedokteran Universitas Sebelas Maret Surakarta. Jl IR Sutami No. 36A Ketingan Jebres Surakarta. *mobile* 081931671212, *e-mail* diding\_hape@yahoo.co.id

## Pendahuluan

Sepsis merupakan penyebab yang paling utama kematian pada pasien kritis meskipun terapi antibiotik dan resusitasi modern telah digunakan. Respons septik merupakan rangkaian peristiwa yang sangat kompleks, yang melibatkan proses inflamasi dan antiinflamasi, reaksi humoral dan seluler, serta kelainan peredaran darah. Produksi sitokin inflamasi yang berlebihan sebagai hasil dari aktivasi *nuclear factor κ-B* (NF-κB) akan menyebabkan aktivasi respons sistemik berupa *systemic inflammatory response syndrome* (SIRS), terutama pada paru-paru, hati, ginjal, usus, dan organ lainnya yang memengaruhi permeabilitas vaskular, fungsi jantung, dan juga menginduksi perubahan metabolik sehingga terjadi apoptosis maupun nekrosis jaringan, *multiple organ failure* (MOF), syok septik, serta kematian.<sup>1</sup>

Mortalitas sepsis di Indonesia masih sangat tinggi. Dari hasil penelitian yang dilakukan di bagian *Perinatal Intensive Care Unit/Neonatal Intensive Care Unit* (PICU/NICU) Rumah Sakit Umum Daerah (RSUD) Dr. Moewardi Surakarta, tingkat mortalitas sepsis 50,2%.<sup>2</sup> Penatalaksanaan sepsis secara dini sangat memengaruhi morbiditas dan mortalitas sepsis. Penggunaan kortikosteroid dengan dosis rendah pada sepsis tahap awal masih diperdebatkan. Kortikosteroid seawal-awalnya direkomendasikan pada penatalaksanaan sepsis, *acute lung injury*, *acute respiratory distress syndrome*, dan *refractory vasodilatory shock*. Penelitian lain sudah mengungkapkan penggunaan kortikosteroid seawal-awalnya akan meningkatkan infeksi nosokomial, polimikrobial, dan jamur selama dirawat di rumah sakit sehingga kortikosteroid meningkatkan risiko kematian ataupun kecacatan pada pasien *acute critical illness*.<sup>3,4</sup> Kortikosteroid dosis rendah (1–1,5 mg/kgBB/hari) menurunkan ekspresi NF-κB dan kaspase-3 intestinal serta mortalitas pada mencit yang diinduksi lipopolisakarida (LPS).<sup>5</sup>

Terapi sepsis yang tepat secara dini merupakan keadaan yang sangat penting dalam pengobatan sepsis. Adrenomedulin (ADM) adalah peptida yang diproduksi berbagai jenis jaringan selama stres fisiologis dan memiliki fungsi pluripoten termasuk vasodilator, antimikrob, dan aktivitas antiinflamasi. Pengukuran kadar ADM mampu membantu diagnosis, pemantauan, dan prognosis sepsis. Pengukuran kadar ADM sebenarnya sulit karena secara cepat hilang dari sirkulasi. Pro-adrenomedulin (pro-ADM) sebagai prohormon yang disekresikan mempunyai rasio molaritas yang sama dengan ADM, dan memiliki waktu paruh lebih panjang dibandingkan dengan ADM matur. Hal ini mengindikasikan bahwa pro-ADM lebih nyata dan memiliki korelasi positif dengan

keparahan penyakit dan sebagai petanda untuk diagnosis sepsis tahap awal.<sup>6,7</sup> Penelitian ini bertujuan untuk menganalisis efek penggunaan kortikosteroid dosis rendah terhadap kadar pro-ADM serum pada mencit Balb/C model sepsis tahap awal, sebagai dasar terapi adjuvan pada sepsis tahap awal yang masih kontroversi.

## Metode

Penelitian ini merupakan penelitian eksperimental laboratoris, dengan sampel 30 ekor mencit Balb/C jantan, dengan bobot ±15–20 g, dan berumur 4–6 minggu yang diperoleh dari Unit Pengembangan Hewan Percobaan, Universitas Setya Budi, Surakarta. Bahan makanan mencit dipergunakan pakan mencit standar.

Penentuan besar sampel dengan menggunakan rumus,<sup>8</sup> yaitu:

$$n = \left[ \frac{(Z_{1/2}\alpha + Z\beta) \sigma}{\delta} \right]^2$$

Keterangan:

- n = besar sampel masing-masing kelompok
- $Z_{1/2}\alpha$  = nilai standar normal, yang besarnya bergantung  $\alpha$
- $Z\beta$  = nilainya bergantung  $\beta$  yang ditentukan (berdasarkan tabel)
- $\delta$  = selisih antara rerata variabel terapi dan kontrol yang diharapkan oleh peneliti
- $\sigma$  = standar deviasi

Dengan rumus tersebut diperoleh minimal sampel tiap kelompok adalah tujuh ekor mencit. Dalam penelitian ini kami menggunakan 10 ekor mencit untuk tiap kelompok karena risiko kematiannya sangat tinggi sesuai persetujuan Komite Etik Fakultas Kedokteran, Universitas Sebelas Maret, Surakarta.

Penelitian ini dilaksanakan di Laboratorium Histologi dan Biomedik, Fakultas Kedokteran, Universitas Sebelas Maret, Surakarta, selama Januari sampai April 2012. Setelah diadaptasikan selama seminggu, hewan coba dibagi menjadi tiga kelompok dan juga masing-masing kelompok terdiri atas 10 ekor. Kelompok I adalah mencit tanpa diberikan perlakuan (sebagai kontrol), kelompok II adalah mencit model sepsis, serta kelompok III adalah mencit model sepsis yang diberi kortikosteroid dosis rendah.

Kortikosteroid yang digunakan adalah metil prednisolon dengan dosis 0,05 mg/mencit dua kali sehari secara intraperitoneal (i.p.). Untuk membuat model sepsis, hewan coba diinokulasi LPS (*E. coli*) dari Sigma Aldrich (Deisenhofen, Germany)

dengan dosis 0,1 mg/mencit/i.p.<sup>9</sup> Pada hari ke-5, mencit dikorbakan. Darah diambil dari jantung diencerkan dengan *ethylenediaminetetraacetic acid* (EDTA) (EDTA:darah=1,5:1), kemudian disentrifugasi dengan kecepatan 3.000 rpm, suhu pada 37 °C selama 15 menit. Serum hasil koleksi digunakan untuk pengukuran kadar pro-ADM mempergunakan *enzyme-linked immunosorbent assay* (ELISA) kit sesuai dengan protokol yang sudah dianjurkan dari pabriknya (Pharmingen, San Diego, California, Amerika Serikat).

Data diolah dengan menggunakan *analysis of variance* (ANOVA) atau alternatifnya;  $p < 0,05$  dipilih sebagai tingkat minimal signifikansinya mempergunakan program *SPSS for Windows Release 15*.

## Hasil

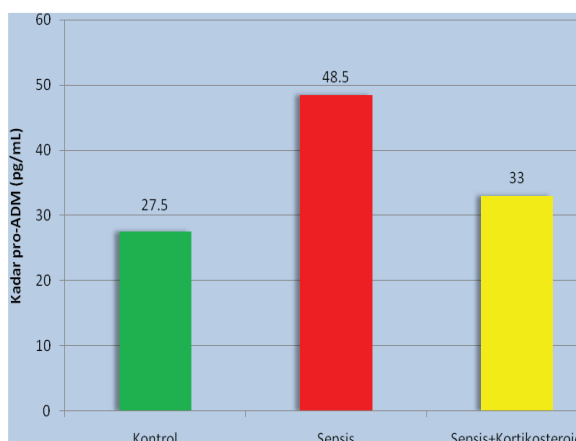
Hasil penelitian ini memperlihatkan kadar pro-ADM kelompok mencit kontrol adalah  $27,5 \pm 1,1$  pg/mL. Injeksi LPS dosis 0,1 mg/mencit/i.p, secara bermakna ( $p < 0,001$ ) meningkatkan kadar pro-ADM pada kelompok mencit sepsis, yaitu  $48,5 \pm 6,1$  pg/mL. Pemberian metil prednisolon dosis 0,05 mg/mencit dua kali sehari i.p. pada mencit model sepsis, secara bermakna ( $p < 0,001$ ) menurunkan kadar pro-ADM menjadi  $33,0 \pm 2,9$  pg/mL.

**Tabel Kadar Pro-ADM Masing-masing Kelompok Perlakuan**

Kelompok Perlakuan	Kadar pro-ADM (rata-rata±simpang baku) (pg/mL)
Kontrol	27,5±1,1
Sepsis	48,5±6,1
Sepsis+kortikosteroid	33,0±2,9

## Pembahasan

Sepsis merupakan suatu sindrom klinis sebagai manifestasi suatu proses inflamasi imunologik yang terjadi karena respons tubuh (imunitas) yang berlebihan terhadap rangsangan produk mikroorganisme. Selama sepsis berat, terjadi kegagalan migrasi neutrofil ke tempat infeksi, yang memberikan kontribusi untuk penyebaran infeksi dan berakibat peningkatan kematian. Penurunan migrasi neutrofil berhubungan dengan penurunan *rolling* dan adhesi neutrofil pada sel endotel, menyebabkan kegagalan eliminasi bakteri di tempat infeksi, meningkatkan jumlah



**Gambar Kadar Pro-ADM Masing-masing Kelompok Perlakuan**

bakteremia, meninggikan kadar sitokin/kemokin serta mortalitas.<sup>10</sup>

Pada penelitian ini diperlihatkan kelompok yang diinjeksi LPS kadar pro-ADM meningkat secara bermakna dibandingkan dengan kelompok kontrol. Hasil ini sesuai dengan penelitian oleh de Kruif dkk.,<sup>11</sup> bahwa injeksi LPS meningkatkan kadar *midregional pro-adrenomedullin* (MR-proADM). Pro-ADM memiliki korelasi positif dengan keparahan penyakit dan sebagai petanda diagnosis sepsis tahap awal.<sup>7</sup> Hasil penelitian Ruilan dan Fu-xin,<sup>12</sup> dilaporkan pro-ADM pada pasien sepsis secara bermakna meningkat dibandingkan dengan pasien kritis noninfeksi. Kadar pro-ADM pada hari pertama meningkat bermakna pada pasien yang tidak selamat dibandingkan dengan yang selamat. Hal ini menunjukkan bahwa pro-ADM merupakan prediktor yang bagus untuk keparahan suatu sepsis. Nilai ambang pro-ADM adalah 0,80 ng/mL dengan spesifisitas 91% dan sensitivitas 73% untuk prediktor kematian pasien di *intensive care unit* (ICU).<sup>13</sup> Mungkin ada dua mekanisme yang bertanggung jawab untuk peningkatan kadar pro-ADM pada sepsis, yaitu sebagai anggota gen reseptor yang mirip kalsitonin, pro-ADM diekspresikan secara luas dan disintesis secara ekstensif selama sepsis dan pembersihan pro-ADM oleh ginjal dan paru-paru berkurang.<sup>12,13</sup>

Penggunaan kortikosteroid dosis rendah pada sepsis tahap awal meskipun masih diperdebatkan, dalam keadaan syok septik (sepsis tahap lanjut), efek kortikosteroid pada imunitas bergantung pada kondisi sebelumnya dan dosis serta waktu pemberiannya. Bukti efek kortikosteroid yang menguntungkan pada infeksi adalah penurunan petanda inflamasi. Penggunaan kortikosteroid dosis rendah yang mempunyai efek antiinflamasi

spektrum luas tanpa menyebabkan penekanan sistem imun atau *immunoparalysis*, mungkin merupakan suatu pilihan untuk mendapatkan stabilitas hemodinamik. Titik tangkap pemberian kortikosteroid dosis yang rendah pada sepsis, yaitu dapat mengurangi respons inflamasi sistemik, menghambat produksi sitokin proinflamasi, menghambat produksi mediator inflamasi seperti siklooksigenase-2, dan dapat menurunkan adhesi leukosit ke sel endotel. Kortikosteroid mampu memblokir jalur inflamasi melalui sejumlah jalur, antara lain kortikosteroid mampu menghambat produksi prostaglandin melalui induksi dan aktivasi *annexin-1*, induksi *mitogen-activated protein kinases (MAPK)* fosfatase-1, dan juga menekan transkripsi siklooksigenase-2.<sup>14</sup>

Hasil penelitian memperlihatkan pemberian kortikosteroid dosis rendah pada hewan coba model sepsis, menurunkan kadar pro-ADM secara bermakna. Hasil ini sejalan dengan penelitian de Kruif dkk.,<sup>11</sup> bahwa pada percobaan dengan pemaparan LPS pada manusia menunjukkan pelepasan pro-ADM dihambat oleh prednisolon yang bergantung terhadap dosis yang diberikan. Pemberian prednisolon dengan dosis rendah pada penelitian ini cukup untuk mengurangi pelepasan dari biomarker inflamasi selama endotoksemia. Efek pemberian prednisolon secara oral sebanding dengan hidrokortison intravena.

Peranan NF- $\kappa$ B mengindikasikan terdapat fungsi yang saling berlawanan. Di sisi lain, NF- $\kappa$ B penting untuk pengaktifan gen proinflamasi, yang penting untuk perbaikan inflamasi dan perlindungan dari apoptosis. Pengaktifan NF- $\kappa$ B *in vivo* yang berlebihan akan menyebabkan kematian. Keadaan ini disebabkan pada tingkatan selular pengaktifan *nuclear factor  $\kappa$ -B (NF- $\kappa$ B)* yang berlebihan mampu menghambat aktivasi respons imun dan peningkatan kepekaan untuk apoptosis.<sup>15</sup> Hasil penelitian penulis sebelumnya kortikosteroid dosis rendah (1–1,5 mg/kg BB/hari), menurunkan ekspresi NF- $\kappa$ B dan kaspase-3 intestinal serta mortalitas pada mencit yang diinduksi LPS.<sup>5</sup>

Selain itu, hasil penelitian ini sejalan dengan hasil penelitian oleh van den Berg dkk.,<sup>16</sup> yang melaporkan pemberian deksametason dengan dosis rendah (0,05 mg/kgBB) meningkatkan *survival*, namun penurunan parameter inflamasi seperti kadar sitokin dan molekul adhesi dalam plasma, paru, ginjal, maupun hati tidak begitu kuat. Sebaliknya, pemberian deksametason dosis sedang (0,25 mg/kgBB) ataupun deksametason dosis tinggi (2,5 mg/kgBB) bermakna menurunkan respons inflamasi tetapi tidak mempunyai efek untuk *survival*. Pemberian deksametason dosis rendah juga bermakna menghambat bakteremia, sedangkan dosis sedang dan dosis besar tidak

menghambat bakteremia.<sup>16</sup>

Simpulan, penggunaan kortikosteroid dosis rendah menurunkan kadar pro-ADM serum pada hewan coba model sepsis tahap awal.

## Ucapan Terima Kasih

Kepada Direktorat Jenderal Pendidikan Tinggi, Departemen Pendidikan Nasional Republik Indonesia yang telah mendanai penelitian ini dalam program DIPA-BLU Universitas Sebelas Maret NO :4304/UN27.06/PN/2012.

## Daftar Pustaka

1. Bosmann M, Ward PA. The inflammatory response in sepsis. *Trends Immunol.* 2012;S1471–4906(12):00162–7.
2. Pudjiastuti. Imunoglobulin intravena pada anak dan bayi dengan sepsis. Kumpulan Makalah. National Symposium: The 2<sup>nd</sup> Indonesian Sepsis Forum. Surakarta, March 7–9<sup>th</sup>, 2008.
3. Aberdein J, Singer M. Clinical review: a systematic review of corticosteroid use in infections. *Crit Care.* 2006;10(1):203.
4. Batzofin BM, Sprung CL, Weiss YG. The use of steroids in the treatment of severe sepsis and septic shock. *Best Pract Res Clin Endocrinol Metab.* 2011;25(5):735–43.
5. Hermawan AG, Prasetyo DH, Pohan HT, Widodo D. Effect of low-dose steroid on NF- $\kappa$ B and caspase-3 intestinal expression in a sepsis mouse model. *Crit Care.* 2011;15(Suppl 3):44.
6. Huang DT, Angus DC, Kellum JA, Pugh NA, Weissfeld LA, Struck J, dkk. Midregional proadrenomedullin as a prognostic tool in community acquired pneumonia. *Chest.* 2009;136(3):823–31.
7. Christ-Crain M, Morgenthaler NG, Struck J, Harbarth S, Bergmann A, Müller B. Mid-regional pro-adrenomedullin as a prognostic marker in sepsis: an observational study. *Crit Care.* 2005;9(6):R816–24.
8. Murti B. Desain dan ukuran sampel untuk penelitian kuantitatif dan kualitatif di bidang kesehatan. Edisi ke-1. Yogyakarta: Gadjah Mada University Press; 2006.
9. Wang XL, Li Y, Kuang JS, Zhao Y, Liu P. Increased heat shock protein 70 expression in the pancreas of rats with endotoxic shock. *World J Gastroenterol.* 2006;12(5):780–3.
10. Alves-Filho JC, de Freitas A, Russo M, Cunha FQ. Toll-like receptor 4 signaling leads to neutrophil migration impairment

- in polymicrobial sepsis. *Crit Care Med.* 2006;34(2):461–70.
11. de Kruif MD, Lemaire LC, Giebelen IA, Struck J, Morgenthaler NG, Papassotiropoulos J, dkk. The influence of corticosteroids on the release of novel biomarkers in human endotoxemia. *Intensive Care Med.* 2008;34(3):518–22.
  12. Rui-lan W, Fu-xin K. Prediction about severity and outcome of sepsis by proatrial natriuretic peptide and pro-adrenomedullin. *Chin J Traumatol.* 2010;13(3):152–7.
  13. Hagag AA, Elmahdy HS, Ezzat AA. Prognostic value of plasma pro-adrenomedullin and antithrombin levels in neonatal sepsis. *Indian Pediatr.* 2011;48(6):471–3.
  14. Rhen T, Cidlowski JA. Antiinflammatory action of glucocorticoids—new mechanisms for old drugs. *N Engl J Med.* 2005;353(16):1711–23.
  15. Grey ST. Regulating inflammation: The yin and yang of NF- $\kappa$ B activation. *Immunol Cell Biol.* 2008;86(4):299–300.
  16. van den Berg JW, van der Zee M, de Bruin RW, van Holten-Neelen C, Bastiaans J, Nagtzaam NM, dkk. Mild versus strong anti-inflammatory therapy during early sepsis in mice: a matter of life and death. *Crit Care Med.* 2011;39(6):1275–81.