

The differences of 25-hydroxyvitamin D levels, leucocyte count, neutrophil limfocyte ratio dan c-reactive protein in elderly with anemia and non-anemia

Vitasari I¹, Purwanto AP², Kusmiyati DK³, A.Z.Juniarto,⁴ Indranila KS²

¹Postgraduate in Biomedicine Program, Faculty of Medicine, Universitas Diponegoro, Semarang;

² Clinical Pathology Department, Faculty of Medicine, Universitas Diponegoro, Semarang

³Biochemistry Department, Faculty of Medicine, Universitas Diponegoro, Semarang

⁴Biology Department, Faculty of Medicine, Universitas Diponegoro, Semarang
Corresponding author.E-mail:vita.indriani@gmail.com

ABSTRACT

Background: Anemia increase along with aging. 25-hydroxyvitamin D deficiency is associated with anemia of inflammation in the elderly involving inflammation marker. In this study we attempted to investigate differences of 25-hydroxyvitamin D levels, leucocyte count, NLR and CRP levels in elderly with anemia and non-anemia.

Methods: This study was an observational cross sectional conducted in 40 elderly with anemia and 38 elderly with non-anemia. 25-hydroxyvitamin D, leucocyte count, NLR and CRP, were examined. For statistical analysis, Saphiro Wilk and Mann Whitney differences analysis were conducted.

Results: There were a significant differences between 25-hydroxyvitamin D levels ($p = 0.000$), leucocyte count ($p = 0.022$), NLR $p = 0.002$) and CRP levels ($p = 0.000$) in elderly with anemia and non-anemia.

Conclusion: This study showed that there were difference between 25-hydroxyvitamin D, leucocyte count, NLR and CRP in elderly with anemia and non-anemia.

Key words: elderly, anemia, 25-hydroxyvitamin D, leucocyte count, NLR, CRP

ABSTRAK

Latar belakang: Kejadian anemia meningkat seiring peningkatan usia pada penduduk usia lanjut. Anemia pada usia lanjut salah satunya akibat defisiensi 25-hydroxyvitamin D. Defisiensi 25-hydroxyvitamin D, dapat mengakibatkan anemia melalui mekanisme inflamasi yang melibatkan petanda inflamasi.

Tujuan: Membuktikan perbedaan kadar 25-hydroxyvitamin D, jumlah leukosit, NLR dan kadar CRP pada usia lanjut dengan anemia dan non anemia.

Metoda Penelitian: Penelitian ini dilakukan dengan metode observasi potong lintang melibatkan 40 usia lanjut pria dengan anemia dan 38 usia lanjut non anemia. Pengukuran dilakukan pada 25-hydroxyvitamin D, jumlah leukosit, NLR dan CRP. Pada analisis statistic, dilakukan analisa Saphiro Wilk dan Mann Whitney.

Hasil: Terdapat perbedaan signifikan kadar 25-hydroxyvitamin D ($p=0,000$), jumlah leukosit ($p=0,022$), NLR ($p=0,002$) dan kadar CRP ($p=0,000$) antara usia lanjut dengan anemia dengan non anemia.

Simpulan: Penelitian ini menunjukkan perbedaan kadar 25-hydroxyvitamin D, jumlah leukosit, NLR dan kadar CRP antara usia lanjut dengan anemia dengan non anemia.

Kata kunci : usia lanjut, anemia, 25-hydroxyvitamin D, jumlah leukosit, NLR, CRP

PENDAHULUAN

Angka kejadian anemia meningkat sejalan dengan peningkatan jumlah penduduk usia lanjut. *The Third National Health and Nutrition Examination Survey* (NHANES III) menyatakan bahwa insiden terjadinya anemia pada usia lanjut >65 tahun, laki-laki 11% dan wanita 10%.¹ Menurut data Riset Kesehatan Dasar (Riskesdas 2013), proporsi anemia penduduk Indonesia tahun 2013 pada kelompok usia 55-64 tahun 25,0%, 65-74 tahun 34,2% dan usia ≥ 75 tahun 46%. Data tersebut menunjukkan bahwa proporsi anemia

Anemia pada usia lanjut menurut secara praktik klinis menurut *World Health Organization* (WHO) dapat dilihat dari penurunan kadar hemoglobin, jumlah eritrosit dan hematokrit.³ Penelitian Patel K (2008) mengenai anemia pada penduduk usia lanjut menunjukkan bahwa sekitar sepertiga dari kasus disebabkan defisiensi zat gizi, sepertiga anemia akibat inflamasi atau penyakit kronis dan sepertiga berikutnya dari kasus yang masih belum dapat dijelaskan.⁴

Anemia pada usia lanjut dapat terjadi akibat defisiensi *25-hydroxyvitamin D* yang mengakibatkan resistensi eritropoetin pada *hematopoietic stem cell*. Terdapat interaksi antara meningkatnya kebutuhan eritropoetin (EPO) dan penurunan kemampuan ginjal untuk menghasilkan hormon yang memadai untuk memenuhi kebutuhan hormon EPO. Penelitian Sim *et al* (2010) dan Han *et al* (2013) lebih lanjut menyatakan usia lanjut terkait dengan peningkatan ekspresi sitokin proinflamasi dan dapat berkontribusi terhadap resistensi EPO.^{6,7} Ferruci *et al* (2010) menyatakan ekspresi sitokin proinflamasi dapat mempengaruhi perkembangan anemia melalui induksi ekspresi hepsidin maupun sitokin yang menghambat pembentukan *erythroid colony formation*.⁸

Penelitian yang dilakukan Lucisano *et al* (2014) menunjukkan bahwa peningkatan risiko insufisiensi dan defisiensi *25-hydroxyvitamin D* pada usia lanjut diakibatkan berbagai faktor termasuk kurangnya paparan sinar matahari, diet rendah *25-hydroxyvitamin D* dan penurunan fungsi ginjal.⁹

Insufisiensi maupun defisiensi *25-hydroxyvitamin D* akan meningkatkan ekspresi sitokin proinflamasi, meliputi *interleukin-1* (IL-1), *interleukin-6* (IL-6) dan *tumor necrosis factor alpha* (TNF- α) sesuai penelitian yang dilakukan Todd

et al (2011) dan Santoro *et al* (2015).¹⁰ Peningkatan sitokin proinflamasi akan memacu peningkatan jumlah leukosit, *Neutrofil Limfosit Ratio* (NLR) dan *C-Reactive Protein* (CRP) sebagai petanda yang efektif terhadap adanya proses inflamasi.¹¹

Berdasarkan latar belakang tersebut diatas maka perlu dilakukan penelitian mengenai perbedaan kadar *25-hydroxyvitamin D*, jumlah leukosit, NLR dan kadar CRP antara anemia dan non anemia pada usia lanjut.

METODE

Desain penelitian adalah penelitian analitik observasional dengan pendekatan *cross sectional*. Pemeriksaan fisik, anamnesis, persetujuan *informed consent* untuk skrining sampel penelitian di laksanakan di Posyandu Lansia Kecamatan Sokaraja kabupaten Banyumas. Kriteria inklusi meliputi pria, usia ≥ 60 tahun dan tekanan darah normal. Kriteria eksklusi adalah riwayat hipertensi, penyakit ginjal kronik, diabetes mellitus, *congestive heart failure*, penyakit hepar, suplemen vitamin D, sampel hemolisis, sampel lipemik, dan terdapat bekuan dalam sampel darah Data dianalisis menggunakan uji perbedaan *Mann Whitney*. Hasil analisis disajikan dalam bentuk tabel. Penelitian telah mendapat *ethical clearance no 725/EC/FK_RSDK/2016* dari Komisi Etik Penelitian Kesehatan Fakultas Kedokteran Universitas Diponegoro/ RSUP dr Kariadi Semarang

HASIL

Kriteria anemia dan non anemia pada usia lanjut didapatkan melalui pemeriksaan kadar hemoglobin, hematokrit dan jumlah eritrosit berdasarkan nilai rujukan pada responden pria. Status vitamin D diperoleh dari pemeriksaan kadar *25-hydroxyvitamin D*. Status inflamasi diperoleh dari pemeriksaan jumlah leukosit , NLR dan kadar CRP. Data mengenai karakteristik subjek penelitian dapat dilihat pada tabel 1.

Tabel 1. Karakteristik subjek penelitian

| Karakteristik Subjek (n=78) | Rerata ± SB | Median (min-maks) |
|--|-------------|----------------------|
| Usia (tahun) | 65,12±4,07 | |
| Hb (gr%) | | 13(7,10-15,8) |
| Ht (%) | | 33,00(23,90-40,70) |
| Jumlah eritrosit(x10 ⁶ /uL) | 3,4±1,16 | |
| 25-hydroxyvitamin D | | 20,15(4,37-53,39) |
| Jumlah leukosit (x10 ³ /uL) | | 7,1(3,3-14,4) |
| NLR | | 2,02(0,89-5,10) |
| CRP (mg/L) | | 4,69(1,1-10,5) |

Keterangan: SB : simpang baku; min : minimum; maks : maksimum

Karakteristik subjek penelitian berdasarkan status anemia disajikan pada tabel 2.

Tabel 2. Karakteristik subjek berdasarkan status anemia

| Variabel | Anemia (n=40) Median (min-maks) | Non Anemia (n=38) Median (min-maks) | p |
|--|---------------------------------------|---|-------|
| 25-hydroxyvitamin D (ng/ml) | 12,38(4,37-20,16) | 29,17(20,57-53,39) | 0,000 |
| Jumlah leukosit (x10 ³ /uL) | 8,05(3,3-14,4) | 6,7(4,8-8,9) | 0,022 |
| NLR | 2,76(0,89-5,10) | 1,97(1,36-2,35) | 0,002 |
| CRP (mg/L) | 10,03(1,1-10,5) | 2,43(1,1-9,11) | 0,000 |

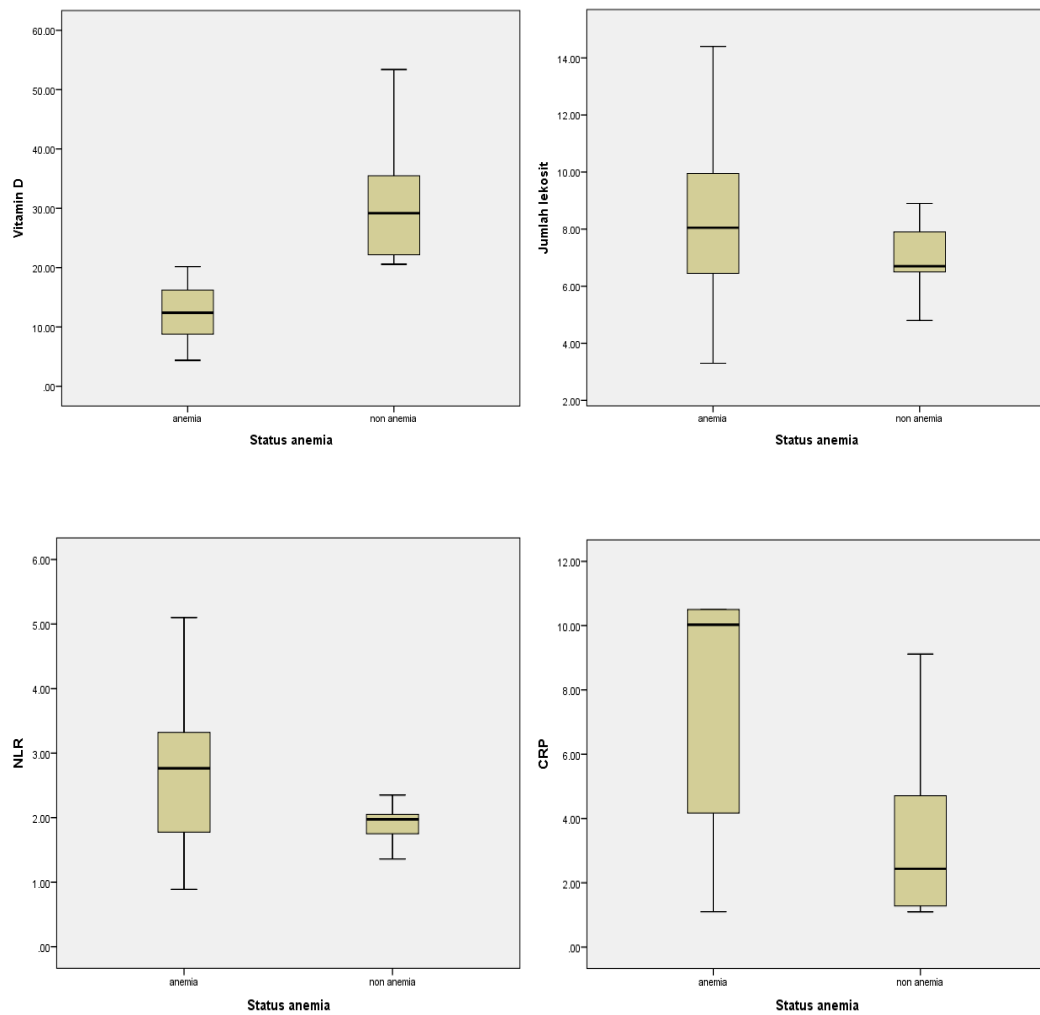
Keterangan: SB : simpang baku; min : minimum; maks : maksimum

Hasil pemeriksaan 25-hydroxyvitamin D berdasarkan status anemia ditunjukkan pada tabel 3.

Tabel 3. Distribusi kadar 25-hydroxyvitamin D berdasarkan status anemia dan non anemia

| Kadar 25-hydroxyvitamin D | Anemia (n=40) | Non Anemia (n=38) | N | % |
|---------------------------|------------------|----------------------|----|-------|
| Defisiensi (<10ng/ml) | 16(40%) | 0(0%) | 16 | 20,51 |
| Insufisiensi (10-30ng/ml) | 22(55%) | 22(57,89%) | 44 | 56,41 |
| Normal (30-100ng/ml) | 2(5%) | 16(42,11%) | 18 | 23,08 |

Hasil analisis statistik menggunakan uji perbedaan *Mann Whitney* didapatkan perbedaan yang signifikan($p \leq 0,05$). Gambar boxplot distribusi kadar 25-hydroxvitamin D, jumlah leukosit, NLR dan kadar CRP berdasarkan status anemia dapat dilihat pada gambar 1.



Gambar 1. Boxplot perbedaan *25-hydroxyvitamin D*, jumlah leukosit, NLR dan CRP

PEMBAHASAN

Distribusi usia pada usia lanjut dengan anemia pada penelitian ini terjadi pada rentang usia 60-74 tahun dengan rerata usia 65,13 tahun. Data ini sesuai dengan penelitian yang dilakukan *In the Third National Health and Nutritional Examination Survey (NHAES III)*, anemia pada usia lanjut terbanyak pada usia > 65 tahun.¹

Resistensi eritropoetin yang terjadi pada usia lanjut dapat terjadi melalui mekanisme inflamasi pada organ ginjal maupun sistemik, akibat defisiensi vitamin D. Kurangnya paparan sinar ultraviolet akan menurunkan aktivasi pre-hormon yang ada di permukaan kulit, sehingga akan menurunkan kadar vitamin

D3 (*cholecalciferol*) aktif. Penurunan kadar vitamin D2 dan D3 akan menurunkan kadar *25-hydroxyvitamin D* dalam serum.¹²

Hasil penelitian menunjukkan sebagian besar responden mengalami insufisiensi vitamin D (56,41%). Peningkatan risiko insufisiensi vitamin D pada usia lanjut diakibatkan berbagai faktor termasuk kurangnya paparan sinar matahari, penurunan diet makan yang mengandung vitamin D, serta penurunan sintesis dan metabolisme vitamin D.^{11,12} Penelitian Ernst *et al* (2015)¹³ menyebutkan bahwa insufisiensi dan defisiensi vitamin D berhubungan dengan proses terjadinya anemia pada usia lanjut.

Penelitian yang dilakukan Meguro *et al*¹⁴, Sim JJ *et al*⁵ dan Bentli *et al*¹⁵ menunjukkan hasil yang sama, dimana defisiensi dan insufisiensi vitamin D akan mengakibatkan anemia pada usia lanjut. Defisiensi dan insufisiensi vitamin D akan menurunkan ekspresi *vitamin D receptor* (VDR), sehingga mengakibatkan resistensi EPO pada *hemapoetic stem cells*. Proses ini akan mengakibatkan gangguan proses eritropoesis.¹²

Mekanisme lain mengenai hubungan anemia dengan defisiensi dan insufisiensi *25 hydroxyvitamin D* menunjukkan penurunan aktivasi *vitamin D receptor* (VDR) akan menurunkan kadar kalsium serum dan fungsi regulasi hormon paratiroid (PTH), sehingga mengakibatkan demineralisasi tulang pada sumsum tulang dan terjadilah fibrosis. Defisiensi dan insufisiensi vitamin D akan diikuti dengan peningkatan kadar sitokin proinflamasi dan hepsidin.^{16,17} Peningkatan sitokin proinflamasi dalam hal ini IL6, IL1, TNF- α dapat menurunkan umur hidup eritrosit, gangguan eritropoesis, diikuti progresivitas resistensi EPO. Peningkatan hepsidin yang disintesis oleh hepar akibat adanya inflamasi, menghambat metabolisme besi, absorpsi besi di usus dan blokade pelepasan besi, yang akan menurunkan kadar besi dalam sirkulasi.¹⁸ Perbedaan yang signifikan terdapat pada kadar *25-hydroxyvitamin D* ($p=0,000$), sesuai perannya pada tingkat seluler. Penelitian yang dilakukan Todd *et al* (2011) menyebutkan bahwa defisiensi vitamin D akan mengakibatkan peningkatan produksi sitokin proinflamasi yang mengarah pada proses terjadinya anemia.¹⁹ Penelitian Santoro *et al* (2015),¹⁰ menunjukkan bahwa defisiensi dan insufisiensi

25-hydroxyvitamin D menghambat modulasi *vitamin D receptor* (VDR). Hambatan pada VDR mengakibatkan peningkatan ekspresi sitokin proinflamasi di stroma dan sel, peningkatan sitokin proinflamasi diikuti dengan peningkatan hepsidin. Hepsidin akan menghambat metabolisme besi dan absorpsi besi di usus serta blokade pelepasan besi ferroportin oleh makrofag.¹⁸

Hasil pemeriksaan jumlah leukosit pada usia lanjut dengan anemia lebih tinggi dari pada non anemia. Hasil uji statistik kedua kelompok menunjukkan terdapat perbedaan yang signifikan ($p=0,022$). Hasil ini sesuai dengan penelitian Yildirim *et al* (2013)²⁰ terdapat perbedaan jumlah leukosit antara penderita anemia pada penyakit ginjal kronik maupun tidak. Peningkatan jumlah leukosit pada anemia dapat terjadi akibat adanya proses inflamasi dikaitkan dengan kadar *25-hydroxyvitamin D* pada kelompok anemia yang berada pada kategori insufisiensi dan defisiensi. Pada kondisi inflamasi leukosit merupakan sistem imun non spesifik yang pertama kali menuju lokasi inflamasi, sehingga jumlahnya akan meningkat pada anemia dimana terjadi proses inflamasi.

Hasil pemeriksaan NLR pada usia lanjut dengan anemia lebih tinggi dari pada non dan uji statistik menunjukkan terdapat perbedaan yang signifikan ($p=0,002$). Hal ini dapat disebabkan oleh mekanisme peningkatan neutrofil, serta penurunan limfosit dapat terjadi pada proses inflamasi. Inflamasi pada anemia usia lanjut dapat diakibatkan oleh defisiensi vitamin D, sehingga didapatkan hasil terdapat perbedaan *25-hydroxyvitamin D* antar dua kelompok. Anemia usia lanjut merupakan proses kronis, seperti diabetes melitus, penyakit jantung maupun ginjal. Inflamasi yang kronis akan mengakibatkan peningkatan jumlah neutrofil diikuti penurunan jumlah limfosit.²¹ Hasil ini sesuai dengan penelitian Mellentin *et al* (2013)²² yang mengambil subjek antara perokok maupun tidak merokok, mekanisme inflamasi kronis yang terjadi mengakibatkan perbedaan jumlah leukosit, jumlah neutrofil dan limfosit.

Pemeriksaan kadar CRP terdapat perbedaan yang signifikan antara kelompok anemia dengan non anemia ($p=0,000$). Hasil ini sesuai teori yang menyebutkan bahwa peningkatan produksi protein fase akut (CRP) akan mengakibatkan eritropoesis inefektif dengan cara penghambatan proliferasi dan

diferensiasi prekursor eritroid dan resistensi EPO yang dapat mengakibatkan gangguan eritropoiesis di sumsum tulang sehingga mengakibatkan anemia.²³ Hasil ini sesuai dengan penelitian yang dilakukan Mellentin *et al* (2014)²² dan Lee *et al* (2015)²³ dimana terdapat hubungan antara kadar *25-hydroxyvitamin D* dengan CRP melalui mekanisme inflamasi pada responden dengan insufisiensi dan defisiensi *25-hydroxyvitamin D*.

SIMPULAN

Terdapat perbedaan bermakna kadar *25-hydroxyvitamin D*, jumlah leukosit, NLR dan kadar CRP pada usia lanjut dengan anemia dan non anemia.

DAFTAR PUSTAKA

1. Hairani V, Cumming RG, Blyth F, Naganathan V, Le Couteur DG, Waite LM, et al. Cross-sectional and longitudinal associations between the active vitamin D metabolite (1,25 dihydroxyvitamin D) and haemoglobin levels in older Australian men: the Concord Health and Ageing in Men Project. *AGE* 2015;37:1-13.
2. Departemen Kesehatan Republik Indonesia. Riset Kesehatan Dasar (Riskesdas 2013). Jakarta: Badan Penelitian dan Pengembangan Kesehatan Kementrian Kesehatan RI 2013.
3. Barth D, Hirschmann JV. Anemia. in: Wintrobe's Atlas of Clinical Hematology. Tkachuk DC, Hirshmann JV eds. 1th ed. Philadelphia: Lippincott-Williams & Wilkins; 2007:3-47.
4. Patel K. Epidemiology of Anemia in Older Adults *Semin Hematol* 2008;45:210–7.
5. Sim JJ, Lac PT, Liu ILA, Mequerditchian SO, Kimar VA, Kujubu DA, et al. Vitamin D deficiency and anemia: a cross-sectional study. *Ann Hematol* 2010;89:447–52.
6. Han SS, Kim M, Kim H, Lee SM, Jung OY, Kim S, et al. Non-Linear Relationship between Serum 25-Hydroxyvitamin D and Hemoglobin in Korean Females: The Korean National Health and Nutrition Examination Survey 2010–2011. *Plosone* 2013;8:1-7.
7. Ferrucci L, Semba R, Guralnik J. Proinflammatory state, hepcidin and anemia in older persons. *Blood* 2010;115:3810-26.
8. Marwah S, Walls A, Blann A. Relationship between vitamin D and red blood cell indices in South Asians and White Europeans. *BJBS* 2012;69(4):182-5.
9. Lucisano S, Mauro ED, Montalto G, Cernaro V, Buemi M, Santoro D. Vitamin D and anemia. *J Ren Nutr* 2014;24:61-2.

10. Santoro D, Caccamo D, Lucisano S, et al. Interplay of Vitamin D, Erythropoiesis, and the Renin-Angiotensin System. *Biomed Res Int* 2015;1-11.
11. Lucisano S, Mauro ED, Montalto G, Cernaro V, Buemi M, Santoro D. Vitamin D and anemia. *J Ren Nutr* 2014;24:61-2.
12. Holick M, Garabedian M. Vitamin D: photobiology, metabolism, mechanism of action, and clinical applications. In: Favus M, ed. *Primer on the metabolic bone diseases and disorders of mineral metabolism*. 6th ed. Washington, DC: ASBMR; 2006:129-37.
13. Ernst JB, Becker T, Kuhn J, Gummert JF, Zittermann A. Independent Association of Circulating Vitamin D Metabolites with Anemia Risk in Patients Scheduled for Cardiac Surgery. *PLoS ONE* 2015;10:1-12.
14. Meguro S, Tomita M, Katsuki T, Kato K. Plasma 25-hydroxyvitamin D is independently associated with hemoglobin concentration in male subjects with type 2 diabetes mellitus. *Int J Endocrinol* 2011;3:29-81.
15. Bentli R, Taskapan H, Toktas H, Ulutas O, Ozkahraman A, Comert M. Significant Independent predictors of Vitamin D Deficiency in Inpatient and Outpatient of a Nephrology Unit. *Int J Endocrinol*. 2013:1-5
16. Icardi A, Paoletti E, Nicola LD, Mazzaferro S, R. Russo A, Cozzolino M. Renal anaemia and EPO hyporesponsiveness associated with vitamin D deficiency: the potential role of inflammation *Nephrology Dialysis Transplantation*. *Nephrology Dialysis Transplantation* 2013;28:1672-9.
17. Coutard A, Garlantézec R, Estivin S, Andro M, Gentric A. Association of vitamin D deficiency and anemia in a hospitalized geriatric population: denutrition as a confounding factor. *Ann Hematol* 2013;92(5):615–619
18. Garrido P, Ribeiro S, Fernandes J, et al. Iron-Hepcidin Dysmetabolism, Anemia and Renal Hypoxia, Inflammation and Fibrosis in the Remnant Kidney Rat Model. *PLoS One* 2015;10(4):1-24.
19. Todd S, Perlstein, Pande R, Berliner N, Vanasse GJ. Prevalence of 25-hydroxyvitamin D deficiency in subgroups of elderly persons with anemia: association with anemia of inflammation. *Blood* 2011;117:2800-6.
20. Yildirim I, Hur E, Kokturk F. Inflammatory Markers: C-Reactive Protein, Erythrocyte Sedimentation Rate, and Leukocyte Count in Vitamin D Deficient Patients with and without Chronic Kidney Disease. *Int J End* 2013,1;90:737.
21. Büyükkaya E, Karakaş M, Karakaş E, Akçay A, Tanboğa I, Kurt M. Correlation of neutrophil to lymphocyte ratio with the presence and severity of metabolic syndrome. *Clin Appl Thromb Hemost* 2014;20:159-63.
22. Mellentin L, Wallaschofski H, Grotevendt A, Volzke H, Nauck M, Hanneman A. Association between serum vitamin D concentrations and inflammatory markers general adult population. *J Metabol* 2014;63(8):1056-62.
23. Lee H, Kim N, Lim YH, Hong YC. Interaction of Vitamin D and Smoking on Inflammatory Markers in the Urban Elderly. *J Prev Med Public Health* 2015;48(5):249-56.