

PENGARUH PEMBERIAN VITAMIN C TERHADAP KADAR GLUTATION (GSH) TIKUS SPRAGUE DAWLEY YANG TERPAPAR *HEAT STRESS*

Ananta Siddhi Prawara¹, Andrew Johan², Innawati Jusup²

¹Mahasiswa Program Pendidikan S-1 Kedokteran Umum, Fakultas Kedokteran, Universitas Diponegoro

²Staf Pengajar Ilmu Biokimia, Fakultas Kedokteran, Universitas Diponegoro
Jl. Prof. H. Soedarto, SH.,Tembalang-Semarang 50275,Telp. 02476928010

ABSTRAK

Latar Belakang: *Heat stress* adalah suatu keadaan dimana sistem termoregulator tidak dapat mengendalikankan keseimbangan temperatur tubuh. *Heat stress* disebabkan oleh peningkatan suhu lingkungan dan pekerjaan yang berhubungan dengan suhu tinggi. *Heat stress* memiliki efek yang berbahaya bagi tubuh karena dapat menyebabkan peningkatan kadar dari *reactive oxygen species* (ROS). Salah satu antioksidan yang bertanggung jawab untuk mereduksi ROS adalah Glutation (GSH). GSH kadarnya akan menurun ketika tubuh terpapar *heat stress*. Vitamin C digolongkan sebagai antioksidan sistem pertahanan primer berdasarkan kemampuannya mendonorkan elektron untuk mencegah terjadinya oksidasi pada senyawa lain dengan bertindak sebagai agen pereduksi.

Tujuan: Menganalisis pengaruh pemberian vitamin C untuk mencegah penurunan kadar GSH pada tikus *Sprague Dawley* yang terpapar *heat stress*.

Metode: Penelitian ini *true experimental randomized post-test only with control group design* pada tikus yang dibagi ke dalam tiga kelompok yaitu satu kelompok kontrol negatif (K1) yang tidak diberikan induksi *heat stress* dan vitamin C, satu kelompok kontrol positif (K2) yang diberikan paparan *heat stress* 43°C selama 70 menit. Kelompok perlakuan (P) yang diberikan vitamin C dengan dosis 0,075 mg/g berat badan melalui sonde lambung 2 jam sebelum paparan *heat stress* 43°C selama 70 menit.

Hasil: Kadar GSH kelompok kontrol negatif (K1) lebih tinggi 32,16% dibandingkan kadar GSH kelompok kontrol positif (K2) meskipun secara statistik tidak signifikan dengan $p=0,525$. Kadar GSH kelompok perlakuan (P) lebih tinggi 144,44% dibandingkan kadar GSH kelompok kontrol positif (K2) meskipun secara statistik tidak signifikan dengan $p=0,134$.

Kesimpulan: Pemberian vitamin C dapat mencegah penurunan kadar GSH tikus *Sprague Dawley* yang terpapar *heat stress*.

Kata Kunci: Antioksidan, Vitamin C, Glutation, GSH, *Heat Stress*, Radikal bebas

ABSTRACT

EFFECT OF VITAMIN C SUPPLEMENTATION TOWARDS GSH LEVELS IN SPRAGUE DAWLEY THAT WAS EXPOSED WITH HEAT STRESS

Background: Heat stress is a condition where the thermoregulation can't control the temperature balance of the body. It is caused by the rise of environment temperature and occupations that are related to high temperature. Heat stress has harmful effect on human body because it causes the increment of reactive oxygen species (ROS). One of the antioxidant responsible to reduce the ROS is Glutathione (GSH). GSH levels will decrease because of the heat stress. Vitamin C is known to be a vitamin that is commonly used, classified as the primary defense mechanism antioxidant because of its ability acting as electron donor to prevent oxidation in other substances.

Aim: To analyze the effect of vitamin C supplementation in preventing the reduction of GSH levels in Sprague Dawley that was exposed with heat stress.

Methods: A true experimental randomized post-test only with control group design. There were 3 groups, negative control group (K1) which was not exposed with heat stress and was not given vitamin C supplementation, positive control group (K2) which was exposed with heat stress 43°C for 70 minutes; and treatment group (P) which was given with vitamin C 0.075 mg/g weight through feeding tube 2 hours before exposed with heat stress 43°C for 70 minutes.

Results: The GSH levels in the negative control group (K1) was higher 32.16 % than the GSH levels in the positive control group (K2) even though statistically it was not significant with $p=0.525$. The GSH levels in the treatment group (P) was higher 144.44% than the GSH levels in the positive control group (K2) even though statistically it was not significant with $p=0.134$.

Conclusion: Vitamin C has the ability to prevent the reduction of GSH levels in Sprague Dawley rats that had been exposed with heat stress.

Keywords: Antioxidant, Vitamin C, Glutathione, GSH, Heat Stress, Free radical

PENDAHULUAN

Penyakit yang berhubungan dengan cuaca menyebabkan 2000 warga negara Amerika meninggal pada tahun 2000-2016 dan 31% diantaranya meninggal akibat paparan cuaca panas, *heat stroke*, dan *sun stroke*.¹ *World Health Organization* (WHO) pada *Climate and Health Country Profile Indonesia - 2015* menyatakan peningkatan suhu lingkungan di Indonesia dari tahun 1990 ke 2100 bisa mencapai sekitar 3.8⁰ C.² Pekerja yang terpapar *heat stress* dalam industri antara lain pekerja tambang, pabrik besi atau gelas, pertanian, dan konstruksi. Kondisi pekerjaan berat dengan lingkungan panas menambah tingginya akumulasi panas dalam tubuh pekerja.³

Association of Farmworker Opportunity Program (AFOP)

mendefinisikan *heat stress* sebagai hilangnya kemampuan termoregulator tubuh untuk mengeliminasi panas. Suhu inti tubuh yang diukur dari trunkus dan kepala mulai mengalami peningkatan ketika terjadi *heat stress* dan hal ini berdampak pada proses fisiologis tubuh. Termoregulator adalah kemampuan tubuh untuk menjaga homeostasis suhu.⁴ Termoregulasi menjaga suhu tubuh antara 1-2 derajat dari suhu 37°C.⁵ Kinerja dari termoregulator dapat terganggu oleh berbagai faktor, salah satunya adalah suhu lingkungan.^{6,7}

Heat stress memiliki efek yang berbahaya bagi tubuh karena dapat menyebabkan peningkatan kadar dari *reactive oxygen species* (ROS).⁸ *Heat stress* menyebabkan terjadinya penurunan kemampuan sel untuk melakukan

netralisasi ROS sehingga terjadi akumulasi ROS di dalam tubuh.⁹ Salah satu antioksidan yang bertanggung jawab untuk mereduksi ROS adalah Glutation (GSH).¹⁰ GSH tidak dapat mereduksi ROS dengan optimal dalam keadaan *heat stress* karena GSH tidak dapat mengimbangi jumlah ROS yang meningkat dengan pesat. Kerusakan DNA, membran sel, sel-sel di sekitarnya dan jaringan melalui induksi dari kejadian inflamasi merupakan akibat dari kejadian *heat stress*.⁹

Antioksidan dikelompokkan menjadi 2 berdasarkan mekanisme kerjanya yaitu sistem pertahanan antioksidan primer dan sekunder.¹¹ Vitamin C digolongkan sebagai antioksidan sistem pertahanan primer berdasarkan kemampuannya mendonorkan elektron untuk mencegah terjadinya oksidasi pada senyawa lain dengan bertindak sebagai agen pereduksi.¹² Vitamin C dipilih karena bioavailabilitasnya, dalam waktu 0,5 jam vitamin C sudah terdapat di dalam plasma setelah dikonsumsi per oral.¹³

Peningkatan suhu lingkungan, dampak dari *heat stress*, dan pekerjaan yang terpapar *heat stress* melatarbelakangi diadakannya penelitian ini. Penelitian ini bertujuan untuk melihat pengaruh vitamin C sebagai antioksidan dalam mencegah terjadinya stres oksidatif pada tikus

Sprague Dawley akibat paparan *heat stress*. Penelitian ini menggunakan vitamin C dengan dosis 0.075 mg/g berat badan, 2 jam sebelum dilakukan paparan *heat stress* berdasarkan penelitian yang telah dilakukan Sy, E. Kadri, H. dan Yerizel E.¹⁴ Paparan *heat stress* akan diberikan dengan suhu 43°C selama 70 menit yang merupakan paparan *heat stress* akut seperti yang sudah dilakukan pada penelitian sebelumnya oleh Xiaojing Lin.¹⁵ Parameter yang dinilai adalah kadar GSH.

METODE

Penelitian ini merupakan jenis penelitian eksperimental dengan pendekatan *Post Test Only Randomized Control Group Design* yang menggunakan binatang coba sebagai objek penelitian. Data yang digunakan adalah data primer, yaitu hasil absorbansi glutation (GSH) serum. Kriteria inklusi penelitian ini adalah tikus jantan Sprague Dawley, berusia 2 bulan, dan berat badan tikus 250-300 gram. Kriteria Eksklusif pada penelitian ini adalah kelainan anatomis pada tikus dan pada pengamatan visual tikus tampak tidak aktif dan sakit. Kriteria *drop out* penelitian ini adalah tikus mati saat penelitian.

Jumlah sampel yang digunakan pada penelitian ini adalah 18 ekor tikus. Kelompok penelitian ini akan dibagi ke

dalam 3 kelompok yaitu tiga kelompok yaitu kelompok kontrol negatif (K1) yang tidak diberikan induksi *heat stress* dan vitamin C, kelompok kontrol positif (K2) yang diberikan paparan *heat stress* 43°C selama 70 menit, dan kelompok perlakuan (P) yang diberikan vitamin C dengan dosis 0,075 mg/g berat badan melalui sonde lambung 2 jam sebelum paparan *heat stress* 43°C selama 70 menit.

Tikus kemudian diterminasi dan diambil darahnya melalui *plexus retroorbitalis*. Serum yang diperoleh dilakukan pengukuran kadar GSH dengan metode DTNB. Pembacaan absorbansi dilakukan dengan spektrofotometer. Data yang diperoleh diolah dengan program komputer SPSS, kemudian variabel tergantung diuji normalitasnya dengan uji Saphiro Wilk. Bila diperoleh data berdistribusi normal, uji hipotesis dilakukan dengan menggunakan statistik parametrik *one-way analysis of variance* (ANOVA) dan dilanjutkan dengan uji *Post Hoc* untuk perbandingan tiap kelompok.

HASIL PENELITIAN

Pengambilan data penelitian dilakukan Juli 2017. Jumlah sampel penelitian yang memenuhi kriteria inklusi dan eksklusi adalah 15 subjek.

Tabel 1. Hasil pemeriksaan kadar GSH Kelompok K1, K2, dan P

Sampel	Kadar GSH K1 (µg/ml)	Kadar GSH K2 (µg/ml)	Kadar GSH P (µg/ml)
1	116	136	148
2	84	164	180
3	168	92	436
4	168	124	200
5	260	24	356
X ± SD	159,2 ± 66,78	108,0 ± 53,59	264,0 ± 125,15

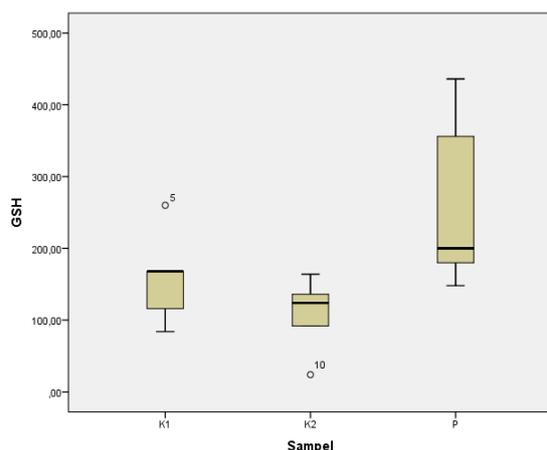
Uji normalitas *Saphiro Wilk* didapatkan sebaran data normal ($p>0,05$) pada semua kelompok dengan nilai $p=0,670$ pada K1, $p=0,635$ pada K2, dan $p=0,279$ pada P. *Levene's Test* menunjukkan varian data tidak homogen dengan nilai $p=0,034$ ($p<0,05$). Uji yang dilakukan selanjutnya adalah uji parametrik *One Way ANOVA*. Hasil uji *One Way ANOVA* didapatkan nilai yang signifikan karena $p<0,05$ dengan nilai $p=0,043$. Uji yang dilakukan selanjutnya adalah uji *Post Hoc*. Hasil uji *Post Hoc* dapat dilihat pada tabel berikut.

Tabel 2. Hasil Uji *Post Hoc* Kadar GSH

Kelompok	K1	K2	P
K1	-	$p=0,525$	$p=0,383$
K2	$p=0,525$	-	$p=0,134$
P	$p=0,383$	$p=0,134$	-

Keterangan: *Signifikan ($p<0,05$)

Tabel uji *Post hoc* menunjukkan perbedaan namun secara statistik tidak signifikan antara kelompok kontrol negatif dan kelompok kontrol positif dengan $p > 0,05$. Perbedaan signifikan dengan $p < 0,05$ ditunjukkan pada perbedaan antara kelompok kontrol positif dan kelompok perlakuan. Perbedaan juga didapatkan antara kelompok kontrol negatif dan kelompok perlakuan, namun tidak signifikan dengan $p > 0,05$. Perbedaan tersebut dapat dilihat pada *box plot* berikut.



Gambar 1. Grafik Boxplot Kadar GSH dalam g/ml

PEMBAHASAN

Kelompok kontrol negatif (K1) yang diberikan pakan standar memiliki rerata kadar GSH sebesar $159,2 \pm 66,78 \mu\text{g/ml}$. Kelompok K1 yang tidak diberikan paparan *heat stress* memiliki kadar GSH yang lebih tinggi 32,16% dibandingkan dengan kelompok K2 yang diberikan paparan *heat stress*. *Heat stress*

menyebabkan terjadinya stres oksidatif yang berusaha dikompensasi tubuh dengan menggunakan antioksidan yang tersedia. Akibat adanya penggunaan tersebut terjadi penurunan kadar antioksidan karena reaksinya dengan oksidan.^{8,16} Kode Aruna *et al* (2008) dalam penelitiannya menyimpulkan merokok yang juga menimbulkan stres oksidatif, menyebabkan terjadinya penurunan antioksidan yang salah satunya adalah GSH.¹⁹ Hasil penelitian ini juga sesuai dengan penelitian yang telah dilakukan sebelumnya oleh Xiaojing Lin *et al* (2017) dimana *heat stress* dapat menurunkan kadar antioksidan tubuh yang salah satunya adalah GSH. Penurunan kadar GSH disebabkan oleh interaksinya dengan hidrogen peroksida. Hidrogen peroksida dihasilkan dari proses netralisasi radikal superoksida oleh SOD.¹⁵ Penurunan kadar GSH akibat paparan stres oksidatif tersebut sejalan dengan hasil penelitian ini.

Antioksidan primer adalah antioksidan yang mengalami kontak langsung dengan ROS dan mengeliminasi. GSH termasuk salah satu antioksidan primer bersama dengan vitamin (A, E, C), asam urat, dan juga enzim yang memanfaatkan ROS seperti SOD dan peroksidase.¹⁷ GSH dan katalase berperan menetralkan produk dari reaksi

SOD yaitu hidrogen peroksida. Jumlah oksidan yang bereaksi dengan SOD akan lebih sedikit sehingga jumlah oksidan yang bereaksi dengan GSH juga lebih sedikit karena antioksidan primer lain juga bereaksi dengan oksidan.^{15,17}

A. I. Ibraimov *et al* (2010) menyatakan konduktivitas panas tubuh manusia yang berhubungan dengan kemampuan termoregulasi manusia dipengaruhi oleh banyaknya kromosom Q-heterokromatin yang terdapat di genom.²⁰ Setiap tikus memiliki kadar GSH yang berbeda setelah dilakukan pemaparan *heat stress* seperti yang dapat dilihat dari variasi kadar GSH setiap tikus dalam satu kelompok. Penurunan kadar GSH yang tidak signifikan dari kelompok K2 setelah pemaparan *heat stress* dapat disebabkan oleh adanya antioksidan lain yang mempengaruhi kadar GSH dan adanya perbedaan toleransi setiap tikus terhadap paparan *heat stress*.

Pemberian vitamin C pada tikus Sprague Dawley dapat meningkatkan Kadar GSH. Kelompok kontrol positif (K2) dengan rerata $108,0 \pm 53,59 \mu\text{g/ml}$ lebih rendah meskipun secara statistik tidak signifikan ($p = 0,134$) dibandingkan kelompok perlakuan (P) dengan rerata $264,0 \pm 125,15 \mu\text{g/ml}$. Kadar GSH kelompok perlakuan (P) lebih tinggi

144,44% dibanding kadar GSH kelompok kontrol positif (K2). GSH berperan penting dalam stres oksidatif sebagai antioksidan. Rasio GSH/GSSG menjadi penentu dari stres oksidatif. GSH bekerja dengan mendonasikan elektronnya secara langsung, menjadi kofaktor dari beberapa enzim seperti GSH peroksidase (GSH-Px) dan transferase, serta berperan dalam mengubah vitamin C ke dalam bentuk aktifnya.²¹

Padayatty SJ *et al* (2003) menyatakan bahwa vitamin C dapat berfungsi sebagai antioksidan dengan mendonorkan elektron bebasnya.¹⁸ Kadar vitamin C intramitokondrial mempunyai dampak anti-apoptosis terhadap sel. Peningkatan kadar ROS mampu menginduksi kolapsnya membran mitokondrial yang bisa menyebabkan apoptosis.²² Viviana Montecinos *et al* (2007) dalam penelitiannya menarik kesimpulan vitamin C berperan dalam dua proses penting yaitu menetralsasi spesies oksidan dan memulihkan kapasitas sel untuk meningkatkan kadar glutation setelah kondisi stres oksidatif.²³ T. A. Ajith *et al* (2007) dalam penelitiannya juga menjumpai vitamin C dapat meningkatkan kadar GSH dan juga antioksidan lainnya karena vitamin C memberikan efek protektif bagi sel dengan secara langsung

bereaksi dengan oksidan.²⁴ GSH juga memiliki peran sebagai agen pereduksi intraselular yang mengubah vitamin C dari bentuk inaktif ke bentuk aktifnya. Ketika kadar vitamin C sudah cukup, maka GSH tidak menjalankan fungsinya sebagai agen pereduksi bagi vitamin C sehingga kadar GSH tidak berkurang.²⁵ Peran dari GSH yang mampu mengubah asam dehidroaskorbat ke bentuk aktifnya (vitamin C) dan vitamin C yang mampu meningkatkan kapasitas sel untuk meningkatkan kadar glutathion selain bekerja langsung dengan cara bereaksi dengan spesies oksidan sesuai dengan hasil penelitian ini.^{21,23} Vitamin C pada penelitian kali ini tidak hanya mempertahankan kadar GSH tapi meningkatkan kadar GSH kelompok perlakuan (P) hingga 1,44x lipat dibandingkan kadar GSH kelompok kontrol positif (K2).

Pemberian vitamin C melalui sonde lambung menyebabkan kadar intravaskular dari vitamin C tinggi. Vitamin C dan GSH akan bereaksi dengan oksidan ketika terjadi paparan *heat stress* karena perannya sebagai antioksidan primer.¹⁷ Kadar vitamin C yang tinggi menyebabkan sel mampu meningkatkan kapasitasnya untuk meningkatkan kadar GSH.^{23,24} GSH di sisi lain berperan juga bereaksi langsung

dengan oksidan dan juga membantu mengubah asam dehidroaskorbat yang telah teroksidasi kembali menjadi vitamin C aktif.²⁵ Peran GSH yang mengubah asam dehidroaskorbat menjadi asam askorbat dan sebagai antioksidan primer menyebabkan peningkatan GSH yang tidak signifikan.

Keterbatasan penelitian ini adalah tidak dilakukan pengukuran kadar GSH sebelum perlakuan *heat stress* sehingga tidak bisa membandingkan kadar GSH sebelum dan sesudah perlakuan pada tikus yang sama. Keterbatasan lainnya adalah penelitian ini dikerjakan pada tikus sehingga belum dapat diimplementasikan ke manusia.

SIMPULAN DAN SARAN

Simpulan

Kadar GSH kelompok kontrol positif (K2) yang terpapar *heat stress* lebih rendah 32,16% dibandingkan kadar GSH kelompok kontrol negatif (K1) yang tidak terpapar *heat stress*. Kadar GSH kelompok perlakuan (P) yang diberikan vitamin C sebelum terpapar *heat stress* lebih tinggi 144,44% dibandingkan kadar GSH kelompok kontrol positif (K2) yang hanya terpapar *heat stress*. Pemberian Vitamin C sebesar 0,075 mg/g berat badan per oral berpengaruh terhadap kadar GSH tikus

Sprague Dawley yang terpapar *heat stress* 43°C selama 70 menit.

Saran

Uji kadar GSH sebelum perlakuan perlu dilakukan untuk mengetahui perbedaan kadar sebelum dan sesudah perlakuan. Pemberian vitamin C dapat dilakukan dengan dosis yang berjenjang, dengan waktu pemberian yang dibuat bervariasi, dan dengan cara pemberian yang lain untuk menentukan pemberian vitamin C yang paling efektif dan efisien. Penelitian ini dapat dilakukan pada manusia untuk melihat efektivitasnya pada manusia secara langsung. Antioksidan lain dapat diuji dengan menggunakan metode yang sama.

DAFTAR PUSTAKA

1. Berko J, Ingram DD, Saha S, Parker JD. Deaths attributed to heat, cold, and other weather events in the United States, 2006-2010. *Natl Health Stat Report*. 2014;(76):1–15.
2. World Health Organization. *Climate and Health Country Profile Indonesia* 2015. p. 1–8.
3. The National Institute for Occupational Safety and Health (NIOSH). *Heat Stress* [Internet]. 2015 [cited 2017 Mar 31]. Available from: <https://www.cdc.gov/niosh/topics/heat> stress/
4. Kondo N, Taylor NAS, Shibasaki M, Aoki K, Muhamed AMC, Taylor NA, et al. Thermoregulatory Adaptation in Humans and Its Modifying Factors. *Glob Environ Res*. 2009;13(131):35–41.
5. Cheshire WP. Thermoregulatory disorders and illness related to heat and cold stress. *Autonomic Neuroscience: Basic and Clinical*. 2016;196:91–104.
6. Werder J. *Heat Stress*. Washington D.C.: Association of Farmworkers Opportunity Program; 2010. p. 9.
7. Miyake Y. Pathophysiology of heat illness: Thermoregulation, risk factors, and indicators of aggravation. *Japan Med Assoc J*. 2013;56(3):167–73.
8. Belhadj Slimen I, Najjar T, Ghram A, Dabbebi H, Ben Mrad M, Abdrabbah M. Reactive oxygen species, heat stress and oxidative-induced mitochondrial damage. *International Journal of Hypertension*. 2014;30(7):513–23.
9. Tumminello RA, Fuller-espie SL. Heat stress induces ROS production and histone phosphorylation in celomocytes of *Eisenia hortensis*. 2013;50–7.
10. Elia AC, Dörr AJM, Mastrangelo C,

- Prearo M, Abete MC. Glutathione and antioxidant enzymes in the hepatopancreas of crayfish *Procambarus clarkii* (Girard, 1852) of lake Trasimeno (Italy). *Bull Français la Pêche la Piscic.* 2006;(380–381):1351–61.
11. Wahlqvist ML. Antioxidant relevance to human health. *Asia Pacific Journal of Clinical Nutrition.* 2013;22(2):171–6.
12. Hacışevki A. An overview of ascorbic acid biochemistry. *Ankara Univ Eczac Fak Derg.* 2009;38(3):233–55.
13. Carr AC, Vissers MCM. Synthetic or food-derived vitamin C-Are they equally bioavailable? *Nutrients.* 2013;5(11):4284–304.
14. Sy, E. Kadri, H. dan Yerizel E. Artikel Penelitian Efek Pemberian Vitamin C Terhadap Aktivitas Katalase Hati Tikus Galur Wistar yang Terpapar Ion Pb. 2015;279–85.
15. Lin X, Lin C-H, Zhao T, Zuo D, Ye Z, Liu L, et al. Quercetin protects against heat stroke-induced myocardial injury in male rats: Antioxidative and antiinflammatory mechanisms. *Chem Biol Interact.* 2017;265:47–54.
16. El-Orabi NF, Rogers CB, Gray Edwards H, Schwartz DD. Heat-induced inhibition of superoxide dismutase and accumulation of reactive oxygen species leads to HT-22 neuronal cell death. *Journal Thermal Biology.* 2011;36(1):49–56.
17. Pradedova E V., Isheeva OD, Salyaev RK. Classification of the antioxidant defense system as the ground for reasonable organization of experimental studies of the oxidative stress in plants. *Russ J Plant Physiol.* 2011;58(2):210–7.
18. Padayatty SJ, Katz A, Wang Y, Eck P, Kwon O, Lee J-H, et al. Vitamin C as an antioxidant: evaluation of its role in disease prevention. *J Am Coll Nutr.* 2003;22(1):18–35.
19. Kode A, Rajendrasozhan S, Caito S, Yang S-R, Megson IL, Rahman I. Resveratrol induces glutathione synthesis by activation of Nrf2 and protects against cigarette smoke-mediated oxidative stress in human lung epithelial cells. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* [Internet]. 2008;294(3):L478-88.
20. Ibraimov AI, Kazakova AK, Moldotashev IK, Sultanmuratov MT, Abdyev KS. Variability of Human Body Heat Conductivity in Population I. Methodological and Theoretical Approaches. *J Hum Ecol.* 2010;32(1):1–22.

21. Birben E, Sahiner UM, Sackesen C, Erzurum S, Kalayci O. Oxidative stress and antioxidant defense. *World Allergy Organ J.* 2012;5(1):9–19.
22. Mandl, J., Szarka, A. and Bánhegyi, G. Vitamin C: update on physiology and pharmacology. *British Journal of Pharmacology.* 2009;157: 1097–1110.
23. Montecinos V, Guzmán P, Barra V, Villagrán M, Muñoz-Montesino C, Sotomayor K, et al. Vitamin C is an essential antioxidant that enhances survival of oxidatively stressed human vascular endothelial cells in the presence of a vast molar excess of glutathione. *J Biol Chem.* 2007;282(21):15506–15.
24. Ajith TA, Usha S, Nivitha V. Ascorbic acid and α -tocopherol protect anticancer drug cisplatin induced nephrotoxicity in mice: a comparative study. *Clin Chim Acta.* 2007;375(1–2):82–6.
25. Linster CL, Van Schaftingen E. Vitamin C: Biosynthesis, recycling and degradation in mammals. *FEBS J.* 2007;274(1):1–22.