

Peranan vitamin-C pada fagositosis makrofag terhadap *C. albicans*

Melok Tin H, Arief Budiyanto, Y. Widodo Wirohadidjojo
Bagian / SMF Ilmu Kesehatan Kulit dan Kelamin
Fakultas Kedokteran UGM / RS Dr. Sardjito
Yogyakarta

ABSTRACT

Melok Tin H, Arief Budiyanto, Y. Widodo Wirohadidjojo - *The role vitamin-C on phagocytosis of macrophage on C. albicans.*

Background: Several studies reported that vitamin-C can enhance immune response, including phagocytosis response on bacteria and virus. However at present there are only a few studies about the role of vitamin-C in phagocytosis response on fungi.

Objectives: To determine the role of vitamin-C on macrophage phagocytosis on *C. albicans*.

Methods: Ten ml blood was taken from healthy subject. Buffy coat containing monocytes was separated from the red-blood cells. After plating the mononuclear cells on the coverslip glass, the cells other than monocytes were washed out by trypsinization. The monocytes were treated with several doses of vitamin-C i.e. 200 mg/mL, 100 mg/mL, 50 mg/mL, and 0 mg/mL as placebo. And then *Candida* suspension was added to the cells, stained PAS and HE counterstain. The result of macrophage phagocytosis activity was interpreted by counting intracellular *Candida* spores and was analyzed using one way ANOVA.

Result: There is a high significant difference in the number of intracellular *Candida* spores, between vitamin-C 200 mg/mL compared to placebo ($p < 0.000$); and there wasn't significant difference between 100mg/mL ($p = 0.064$) and 50 mg/mL ($p = 0.709$) compared to placebo.

Conclusion: The dose of 200 mg/mL vitamin-C could increased macrophage phagocytosis activity on *C. albicans* significantly ($p < 0.01$) compared to other doses.

Key word: *phagocytosis - macrophage - vitamin-C - C. albicans*

ABSTRAK

Melok Tin H, Arief Budiyanto, Y. Widodo Wirohadidjojo - *Peranan vitamin-C pada fagositosis makrofag terhadap C. albicans*

Latar belakang: Berbagai penelitian melaporkan Vitamin-C mampu meningkatkan respon imun, termasuk respon fagositosis makrofag terhadap bakteri dan virus. Namun belum banyak yang meneliti tentang peranan vitamin-C pada respon fagositosis makrofag terhadap jamur.

Tujuan penelitian: Mengetahui peranan vitamin-C pada aktivitas fagositosis makrofag terhadap *C. albicans*

Metode penelitian: Sepuluh relawan sehat diambil darah sebanyak 10 ml. Monosit yang diperoleh dari *buffy coat* dipisahkan dari sel lainnya. Setelah menempel di *coverslip-glass*, dicuci dengan tripsin dan masing-masing diberi berbagai dosis vitamin-C: 200 mg/mL, 100 mg/mL, 50 mg/mL dan sebagai plasebo 0 mg/mL. Kemudian diberi suspensi kandida dan dilakukan pengecatan PAS serta HE *counterstain*. Aktivitas fagositosis makrofag dinilai dengan menggunakan mikroskop berdasarkan jumlah spora kandida intraselular. Perbedaan jumlah spora kandida diuji dengan ANOVA satu jalan.

Hasil: Dijumpai perbedaan sangat bermakna jumlah spora kandida intraselular pada kelompok vitamin-C dosis 200 mg/mL dibanding plasebo ($p < 0,000$) dan perbedaan yang tidak bermakna pada dosis 100 mg/mL ($p = 0,064$) dan 50 mg/mL ($p = 0,709$) dibanding plasebo.

Simpulan: Vitamin-C dosis 200 mg/mL mampu meningkatkan aktivitas fagositosis makrofag terhadap *C. albicans* secara sangat bermakna dibanding dosis lain.

PENDAHULUAN

Fungsi primer sistem imun pada tubuh terhadap berbagai mikroorganisme patogen antara lain ditentukan oleh tingginya respon imun yang dibawa sejak lahir (*innate immune response*), di antaranya didapat dari berbagai mikronutrien.¹² Mikronutrien yang berasal baik dari sayuran, buah maupun suplemen, melalui sekresi sitokin dan regulasi *innate immune response* akan menyebabkan timbulnya respon imun adaptif (*adaptive respon immune*), yang akan melawan mikroorganisme.¹ Mikronutrien yang diketahui dapat meningkatkan respon imun antara lain adalah antioksidan yang meliputi vitamin E, C, karotenoid, dan selenium.^{1,3,5} Berbagai penelitian menunjukkan bahwa vitamin-C dan E merupakan antioksidan poten yang mempunyai peranan meningkatkan respon imun baik pada proses perlekatan (*adherence*), kemotaksis, fagositosis maupun produksi anion superoksida dengan melalui respon proliferasi limfosit⁶ stimulasi proses fagositosis, makrofag⁷, dan sel polimorfonuklear terutama neutrofil.⁸⁻⁹ Pada berbagai mekanisme tersebut ternyata stimulasi proses fagositosis baik oleh makrofag ataupun neutrofil memegang peranan penting dalam meningkatkan respon imun adaptif.

Selama ini penelitian peran suplementasi vitamin E terhadap stimulasi proses fagositosis neutrofil dalam meningkatkan respon imun telah banyak diteliti^{4,6}, sedangkan peranan suplementasi vitamin-C dalam meningkatkan respon imun melalui stimulasi fagositosis makrofag belum banyak diteliti dan masih terbatas pada jenis mikroorganisme patogen, yaitu bakteri dan virus.

Berbagai penelitian telah banyak menunjukkan bahwa peranan antioksidan, yaitu vitamin-C adalah meningkatkan respon imun pada berbagai penyakit, baik infeksi bakteri maupun virus.^{3,9,10-11} Pada infeksi virus, sebagai contoh influenza, pemberian vitamin-C mempunyai efek imunoregulasi dan efek antiviral sehingga selain mengurangi simptom juga dapat menghambat patomekanisme penyakit. Diduga pada penelitian yang menggunakan isolasi sel imun baik secara *in vivo* maupun *in vitro* pada binatang maupun manusia, pemberian vitamin-C dapat menyebabkan peningkatan respon imun melalui peningkatan produksi molekul imunoregulasi yaitu sitokin.⁵ Pada infeksi bakteri vitamin-C mempunyai peranan

menghambat oksidasi dan menghambat kolonisasi bakteri. Dengan demikian peranan vitamin-C, selain sebagai antioksidan, ternyata juga mempunyai peranan sebagai antimikroba.^{3,9,12}

Makrofag dapat berasal dari monosit yang mengalami maturasi akibat pacuan *granulocyte-macrophage colony stimulating factor* (GM-CSF) atau paparan antigen.¹³ Makrofag dapat mengenali antigen dinding sel jamur (mannan) kemudian memfagositosis dan merusak antigen tersebut.¹⁴ Pada infeksi jamur, termasuk *C.albicans*, respon imun *innate* diduga juga berperan penting. Kegagalan fagositosis makrofag terhadap *C.albicans* diduga mendasari terjadinya vulvitis kandidosis pada penderita diabetes.¹⁵

Hasil penelitian dewasa ini menunjukkan bahwa pemberian vitamin-C dapat menstimulasi proses fagositosis makrofag, melalui pelepasan sitokin terutama IFN γ yang dengan cara meregulasi sistem imun terjadi perbaikan respon imun.⁷ Stimulasi proses fagositosis makrofag akibat pemberian vitamin-C dapat dinilai, antara lain berdasarkan peningkatan jumlah mikroorganisme yang difagositosis oleh makrofag, seperti yang pernah dilakukan oleh Fuente *et al.*, (1998).

Pada manusia, infeksi kandida selain pada penderita diabetes juga sering dijumpai pada pengguna kontrasepsi oral, pengguna kortikosteroid dan penderita imunokompromis. Penelitian ini dirancang untuk mengetahui peranan vitamin-C pada aktivitas fagositosis makrofag terhadap *C. albicans*.

BAHAN & CARA

Penelitian dilakukan pada September 2004 di Bagian Penyakit Kulit dan Kelamin RS Dr. Sardjito, Yogyakarta.

Subjek

Subjek penelitian adalah makrofag derivat monosit yang diisolasi dari darah perifer 10 orang wanita sehat. Masing-masing diambil darahnya sebanyak 10 ml, ditaruh dalam tabung yang berisi heparin 0,1 ml. Darah diinkubasikan selama 3 jam dalam temperatur kamar, agar eritrosit dan leukosit polimorfonuklear mengendap, kemudian *buffy coat* yang mengandung sel mononuklear diambil.

Isolasi monosit

Isolasi sel mononuklear darah tepi dilakukan dengan protokol isolasi tanpa menggunakan larutan Ficoll® 400 (larutan yang dapat memisahkan sel dengan densitas yang sama tetapi mempunyai ukuran sel yang berbeda). Protokol tanpa Ficoll® 400 ini dapat diakses melalui <http://www.protocol.online>. Secara singkat dilakukan sebagai berikut: darah vena sebanyak 10 ml diambil dari subjek, dicampur 0,2 ml heparin (5000u/ml) dan dibiarkan selama 3 jam. *Buffy coat* yang terbentuk disedot secara hati-hati, disemaikan pada cawan Petri steril (falcon, cat no: Falcon #351006), dan diinkubasi pada inkubator CO₂ (Galaxy S, RS Biotech) pada suhu 37°C dan kadar CO₂ 5% selama 2 jam, agar monosit melekat pada *cover slip*. Setelah itu pada tiap cawan Petri ditambahkan 1 ml RPMI lengkap, yaitu RPMI 1640 (Sigma cat no: R7131) steril yang dilengkapi dengan *gentamycine sulphate* 50ug/ml, *amphotericine B* 2,5ug/ml, dan *fetal bovine serum* 10% (Gibco, cat no: 26140079). Cawan petri tersebut kemudian diinkubasi semalam dalam inkubator.

Pembuatan larutan antigen

Candida sp dari perpustakaan (diisolasi dari lumen vagina wanita berumur 37 tahun) biakan mikologi sub-bagian dermatologi tropis digunakan sebagai sumber spora. Dengan sengkeli, koloni kandida diambil, dilarutkan dalam larutan NaCl steril (ICI cat no: 118, 551), dihitung dengan bilik hitung, dan dibuat suspensi dengan kadar 10⁴ spora/ml. Sementara itu, serum yang telah diambil *buffy coat*nya disentrifus 32 rpm/menit dan supernatannya dicampurkan pada RPMI lengkap yang mengandung 10⁴ spora *Candida sp*/ml, dihomogenisasi dengan *vortex* dan disimpan dalam suhu 4°C sebagai antigen dan sekaligus sebagai sumber GMCSF.

Pembuatan larutan Vitamin-C

Vitamin-C (sediaan ampul 1g/5ml; Roche) dilarutkan dalam RPMI lengkap dengan berbagai konsentrasi. Caranya: 1) vitamin-C 200 mg/ml: 10 ml vit C ditambahkan dalam 9,990 ml RPMI lengkap; 2) vitamin-C 100 mg/ml: 5 ml vit C ditambahkan dalam 9,995 ml RPMI lengkap; 3) vit C 50 mg/ml: 2,5 ml vit C ditambahkan dalam 9,9975

ml RPMI lengkap dan 4) plasebo: 10 ml RPMI lengkap.

Perlakuan

Biakan monosit pada *cover slip* dibagi menjadi 4 kelompok, masing-masing diberi terapi vitamin-C dengan kadar 200 mg/ml, 100 mg/ml, 50 mg/ml yang dilarutkan pada RPMI lengkap seperti uraian di atas. Sebagai plasebo digunakan RPMI lengkap. Perlakuan dikerjakan dengan cara sebagai berikut: medium RPMI lengkap pada biakan sel monosit pada *cover slip* disedot dengan mikropipet, dicuci dengan PBS 3 kali, kemudian dimasukkan medium lengkap yang mengandung berbagai konsentrasi vitamin-C, diinkubasi pada suhu 37°C dan 5% CO₂ selama 24 jam.

Aktivasi monosit menjadi makrofag dilakukan dengan stimulasi antigen, yaitu suspensi kandida seperti yang sering dilakukan para ahli. Caranya: medium disedot, dicuci dengan PBS 2 kali, suspensi kandida sebanyak 100 ml dimasukkan, dan diinkubasi pada suhu 37°C, 5% CO₂ selama 24 jam.

Aktivitas fagositosis makrofag terhadap kandida dideteksi dengan pengecatan PAS dengan *HE counterstain*. Caranya: sisa suspensi kandida disedot, *cover slip* dicuci dengan PBS sebanyak 3 kali, difiksasi dengan methanol dingin selama 3 menit pada temperatur 4°C, dan dilanjutkan dengan meneteskan *Periodic* selama 10 menit dan dicuci air mengalir. Kemudian ditetaskan *Schiff* selama 5 menit dan dicuci air mengalir dan selanjutnya dipulas dengan hematoksilin eosin. Aktivitas fagositosis diukur dengan menghitung banyaknya jumlah spora kandida intraselular dan aktivitas fagositosis makrofag terhadap kandida ditentukan oleh jumlah spora kandida intraselular dibagi banyaknya sel.

Analisis data

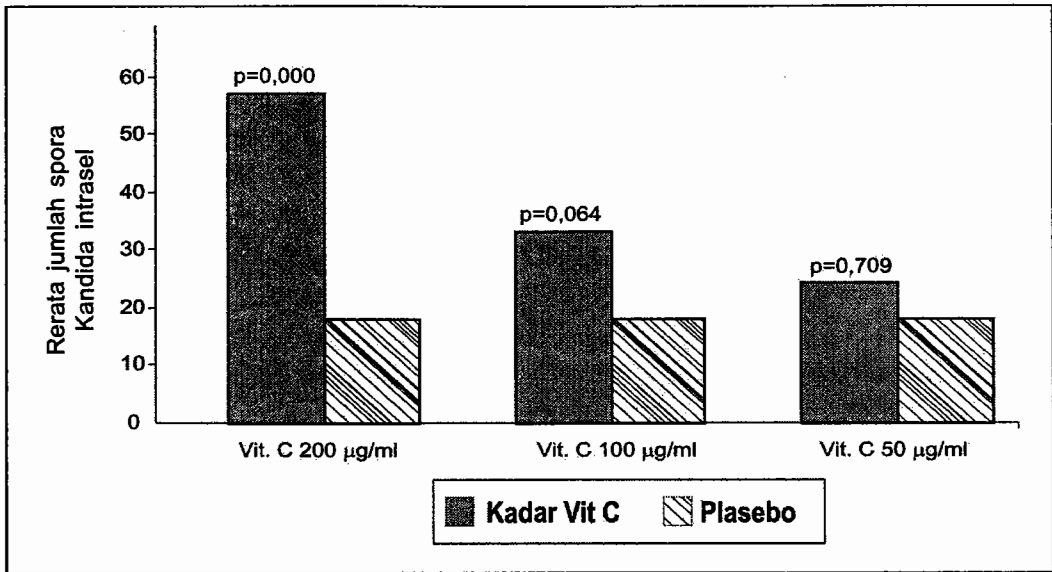
Perbandingan rerata jumlah spora kandida intraselular antara berbagai kelompok perlakuan diuji dengan ANOVA satu jalan (signifikansi $p < 0,05$).

HASIL

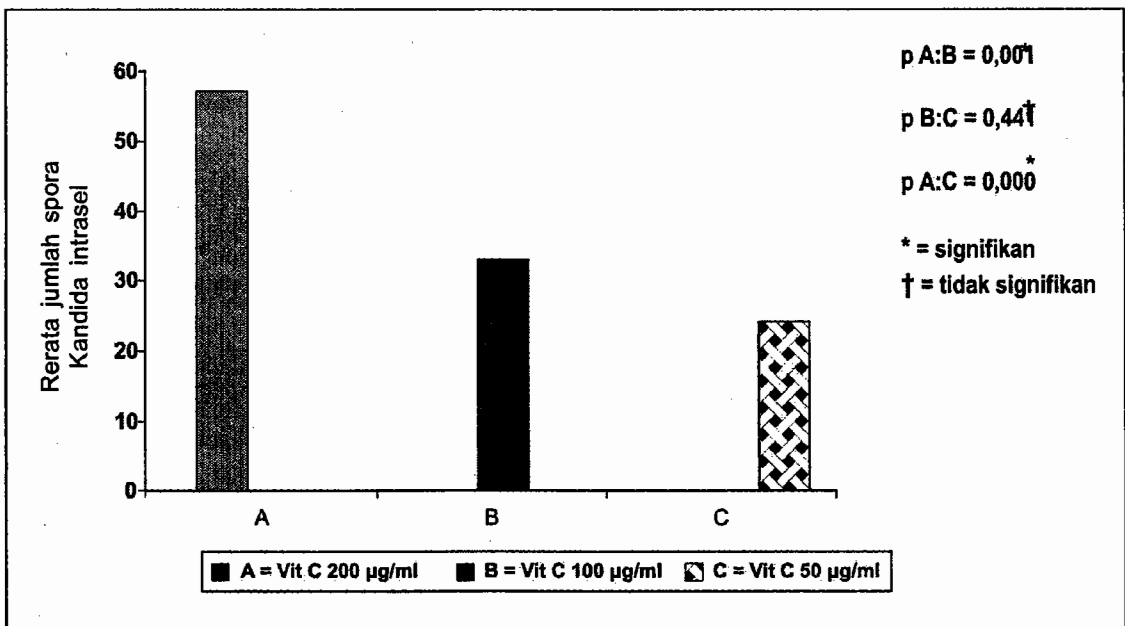
Pada penelitian ini, 10 relawan kesemuanya adalah wanita dan rerata umur adalah $39,5 \pm 11,38$ tahun. Rerata jumlah spora kandida intraselular

pada perlakuan vitamin-C 200 mg/ml adalah 57,00; vitamin-C 100mg/ml adalah 33,00; vitamin-C 50 mg/ml adalah 24,10 dan plasebo adalah 17,80. Analisis varian menunjukkan bahwa dosis vitamin-C 200 mg/ml mempunyai rerata jumlah spora kandida intraselular tertinggi secara sangat bermakna ($p < 0,01$),

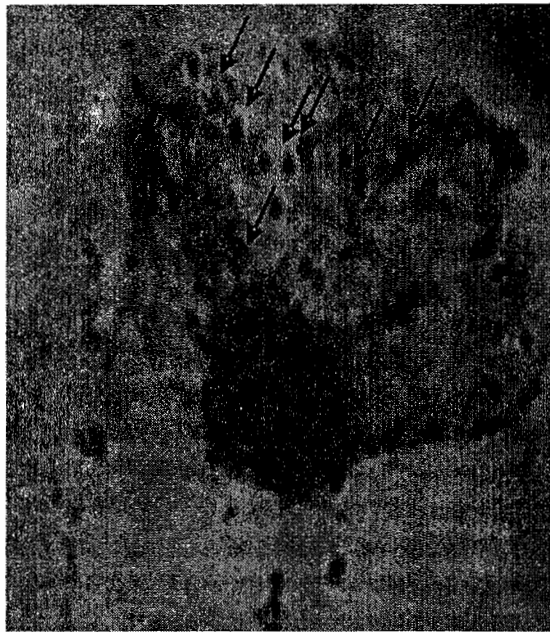
dibanding plasebo, sedangkan dosis vitamin-C 100 mg/ml dan 50 mg/ml tidak menunjukkan peningkatan rerata jumlah spora kandida intraselular yang bermakna terhadap plasebo ($p > 0,05$). Deskripsi rerata dapat dilihat pada GAMBAR 1.



GAMBAR 1. Rerata jumlah spora kandida intraselular pada berbagai dosis vitamin-C



GAMBAR 2. Perbandingan rerata jumlah spora kandida intraselular



GAMBAR 3. Spora kandida yang difagosit makrofag (anak panah)

PEMBAHASAN

Mekanisme fagositosis makrofag terjadi apabila adanya patogen dari berbagai mikroorganisme dikenali terlebih dahulu oleh reseptor makrofag, kemudian baru terjadi opsonisasi dengan komplemen dan Fc reseptor, dan selanjutnya mikroorganisme tersebut difagositosis oleh sel makrofag.¹⁴ Pada penelitian ini, adanya spora kandida intraselular pada kelompok plasebo menunjukkan bahwa kandida tersebut telah difagositosis oleh makrofag. Maka untuk menunjukkan adanya perbedaan aktivitas fagositosis makrofag pada kelompok perlakuan vitamin-C dengan kelompok plasebo, digunakan suatu pengukuran. Pengukuran yang digunakan pada penelitian ini adalah cara yang mirip dengan penelitian yang pernah dilakukan oleh Fuente (1997), yaitu menilai respon imun dilihat dari respon proliferasi sel fagositik.⁶

Adanya spora kandida intraselular pada kelompok plasebo menunjukkan bahwa tanpa pemberian vitamin-C, ternyata aktivitas makrofag dalam memfagositosis kandida adalah rendah. Setelah pemberian vitamin-C terjadi peningkatan jumlah spora kandida intraselular, yang ditunjukkan pada dosis vitamin-C 200 mg/ml, 100 mg/ml dan 50 mg/ml. Peningkatan aktivitas fagositosis makrofag

tersebut bermakna hanya pada dosis vitamin-C 200mg/ml. Dengan demikian dapat disimpulkan bahwa untuk meningkatkan stimulasi fagositosis makrofag terhadap *C. albicans* yang bermakna dalam meningkatkan respon imun tubuh diperlukan dosis vitamin-C minimal sebesar 200mg/ml.

Hasil penelitian ini memberi manfaat, bahwa pada seseorang yang menderita infeksi jamur dengan penyebab *C. albicans*, pemberian suplementasi vitamin-C minimal 200mg/ml akan meningkatkan respon imun adaptif dalam melawan kandida. Karena itu secara umum akan meningkatkan respon imun penderita.

Simpulan hasil penelitian ini mendukung penelitian yang pernah dilakukan oleh Sung Nim (2000), bahwa efek vitamin-C pada penyakit virus adalah melalui efek imunostimulasi dengan memproduksi molekul imunoregulator, berupa sitokin : IFN α /b, IFN γ , dan IL-2 sebagai respon primer dan saat tahap awal infeksi; serta produksi IL-1, TNF α dan IL-6 yang berperan jika terjadi respon inflamasi. Diketahui bahwa sitokin yang paling berperan sebagai regulasi respon imun termasuk fagositosis makrofag adalah IFN γ .⁵

Mekanisme vitamin-C melalui sekresi IFN γ juga dilaporkan oleh Akyon (2002) pada kasus

infeksi bakteri, namun respon imun fagositosis diperankan oleh fagositosis neutrofil dengan menghambat terjadinya kolonisasi kuman.³ Dengan demikian mekanisme vitamin-C dalam meningkatkan respon imun pada penyakit jamur, terutama yang disebabkan oleh *C. albicans* kemungkinan besar juga melalui sekresi IFNg.

Berdasarkan penelitian Fuente *et al.*, (1998) dosis vitamin-C yang sering digunakan sehari-hari adalah 1g (1000mg/ml), dan dosis tersebut dianggap cukup untuk menstimuli respon imun tubuh terhadap mikroorganisme.⁶ Data ini didukung oleh Langseth *et al.*, (1989), bahwa pada pemberian vitamin-C dosis 1g/hari tidak didapatkan efek samping.¹⁶ Sebagai proteksi maupun terapi suportif infeksi jamur, suplementasi vitamin-C tambahan akan membantu tercapainya dosis harian sebesar 1 g, mengingat dosis tersebut sulit dicapai dengan asupan harian biasa, baik melalui sayuran maupun buah-buahan.

SIMPULAN

Vitamin-C dapat meningkatkan aktivitas fagositosis makrofag terhadap *C. albicans* pada dosis 200mg/ml.

KEPUSTAKAAN

1. Susanna CR, Rachel AN, Dnistrian A. Development of Immunocompetence: Role of Micronutrients and Microorganisms. *Nutri Rev*, 2002; 60:S68-S72
2. Liu J, Shapiro JL. Endocytosis and Signal Transduction: Basic Science Update. *Biol Nurs*. 2003; 5:117-28.
3. Akyon Y. Effect of antioxidants on the immune response of *Helicobacter pylori*. *Clin Microbiol Infect*. 2002; 8: 438-41.
4. Tanaka J, Fujiwara H, Torisu M. Vitamin E and Immune response: Enhancement of helper T cell activity by dietary supplementation of vitamin E in Mice. *Immunol*. 1979; 38: 727-34.
5. Han SN and Meydani SN. Antioxidants, Cytokines, and Influenza Infection in Aged Mice. *J Infec Dis*. 2000; 182: 574-80.
6. Fuente MDL, Ferrandez MS, Burgos A, soler A, Prieto A, Miquel J. Immune Function in aged women is improved by ingestion of vitamins C and E. *Can J Physiol.Pharmacol*. 1998; 76: 373-80.
7. Del RM, Ruedas G, Medina S, Victor VM, Fuente DL. Improvement by several antioxidants of macrophage function in vitro. *Life Sci*. 1998; 63: 871-81.
8. Krause R, Patruta S, Daxbock F, Fladerer P, Biegelmayr C, Wenisch C. Effect of vitamin-C on neutrophil function after high-intensity exercise. *Eur J Clin Invest* 2001; 31: 258-63.
9. Levy R, Shriker O, Porath A, Riesenberk K, Schlaffer F. Vitamin-C for the treatment of recurrent furunculosis in patients with impaired neutrophil functions. *I Infect Dis*. 1996; 173: 1502-505.
10. Hemila H. Vitamin-C and the common cold. *Br J Nutr*. 1992; 67: 3-16.
11. Hernanz A, Collazos ME, Fuente DL. Effect of age, culture media and lymphocyte presence in ascorbate content of peritoneal macrophage from mice and guinea pigs during phagocytosis. *Int Arch All Appl Immunol*. 1990.; 91: 166-70.
12. Fuente MDL, Victor VM. Anti-oxidants as modulators of immune function. *Immunol Cell Biol*. 2000; 78:49-54.
13. Gordon S. Mononuclear phagocytosis in immune defence. In:Roitt Brostoff, Male(eds) *Immunology*. 6th ed. Mosby, Edinburgh. 2001;147-60.
14. Aderem A, Underhill DM. Mechanisms of phagocytosis in macrophages. In: *Ann Rev Immunol*. 1999; 17:593-623.
15. Fidel PL, Sobel JD. Immunopathogenesis of recurrent vulvovaginal Candidiasis. *Clin Microbial Rev*. 1996; 9(3): 335-48.
16. Bendich A, Langseth L. Safety of vitamin A. *Am J Clin Nutr*. 1989; 49: 358-71.