

RESPON SITOKIN PADA KULTUR SEL LIMFOSIT SEBAGAI UJI PENTING DALAM PENGEMBANGAN VAKSIN MALARIA IRADIASI

Darlina dan Siti Nurhayati

- Pusat Teknologi Keselamatan dan Metrologi Radiasi – BATAN
Jalan Lebak Bulus Raya 49, Jakarta – 12440
PO Box 7043 JKSKL, Jakarta – 12070
- mdarlina@batan.go.id

PENDAHULUAN

Malaria merupakan penyakit infeksi parasit yang disebabkan oleh *plasmodium* yang menginfeksi eritrosit dalam darah sebagai sumber hidupnya. Penyakit ini masih merupakan salah satu masalah kesehatan di dunia terutama di negara sedang berkembang pada kawasan tropis dan subtropis. *Plasmodium falciparum* (*P. falciparum*) adalah parasit malaria yang terpenting karena penyebarannya luas, angka kesakitan tinggi serta bersifat ganas, hingga sering menyebabkan malaria berat dan menimbulkan lebih dari 2 juta kematian setiap tahun di seluruh dunia. Di Indonesia malaria telah menyebar ke seluruh kepulauan terutama di bagian timur dengan sekitar 15 juta kasus dan 42 ribu kematian akibat malaria tiap tahunnya. Kondisi tersebut diperberat dengan semakin luasnya parasit yang resisten terhadap obat anti malaria yang selama ini digunakan seperti kloroquin dan nyamuk yang resisten terhadap insektisida. Adanya kemampuan parasit untuk tahan terhadap obat baru dan kemampuan vektor nyamuk untuk tahan terhadap insektisida, sehingga vaksin terhadap malaria sangat dibutuhkan.

Pembuatan vaksin dapat dilakukan dari seluruh bagian agen atau suatu bagian yang diisolasi dari agen penginfeksi yang diatenuasi/dilemahkan atau dinon-aktifkan. Salah satu alternatif untuk pembuatan vaksin adalah menggunakan teknik nuklir. Iradiasi dapat mengubah agen patogen menjadi non patogen

yang mampu menstimulasi sistem kekebalan dalam tubuh. Teknik nuklir (iradiasi gamma) dapat melemahkan agen penyakit tanpa menghilangkan daya imunogeniknya dan mampu meningkatkan daya kekebalan pada hewan coba.

Vaksin dapat merangsang sistem imun pada inang untuk melawan infeksi organisme patogen mampu menstimulasi sistem kekebalan dalam tubuh. Tujuan pemberian vaksin stadium darah adalah untuk menekan keganasan parasit bukan menginduksi imunitas steril. Target pada vaksin stadium aseksual adalah merozoit. Imunitas pada stadium ini berupa antibodi yang mengaglutinasi merozoit sebelum skizon matang pecah, menghambat masuknya merozoit ke dalam sel eritrosit. Disamping antibodi, mekanisme imun yang diperantarai sel juga sangat berperan dalam imunitas terhadap malaria. Respon hospes terhadap infeksi malaria merupakan reaksi yang sangat kompleks yang melibatkan respon imunitas humoral yang diperantarai oleh antibodi dan imunitas selular yang diperankan oleh limfosit. Sel ini menyebar keseluruh tubuh melalui sirkulasi darah dan limpa dan menetap secara permanen dalam organ limpa dan nodus limfa. Sel limfosit yang berperan terhadap respon imunitas adalah sel limfosit B sedangkan respon imunitas seluler diperankan sel T. Reaksi imunitas selular yang terjadi dalam tubuh hospes baik yang imun maupun yang tidak imun selama infeksi malaria menyangkut aktivitas sel limfosit T dan sel makrofag yang merupakan kunci

mekanisme pertahanan tubuh terhadap infeksi malaria.

Limfosit merupakan sel yang berperan dalam respon imun karena mempunyai kemampuan untuk mengenali antigen melalui reseptor permukaan khusus dan membelah diri menjadi sejumlah sel dengan spesifitas yang identik serta masa hidup yang panjang menjadikan sel yang ideal untuk respons adaptif. Sel limfosit T berperan dalam imunitas seluler. Limfosit T yang berperan dalam imunitas terhadap parasit stadium eritrosit adalah limfosit T CD4+. Limfosit T CD4+ membunuh Plasmodium intraeritrosit banyak melibatkan sitokin-sitokin baik sebagai efektor langsung maupun sebagai pemacu.

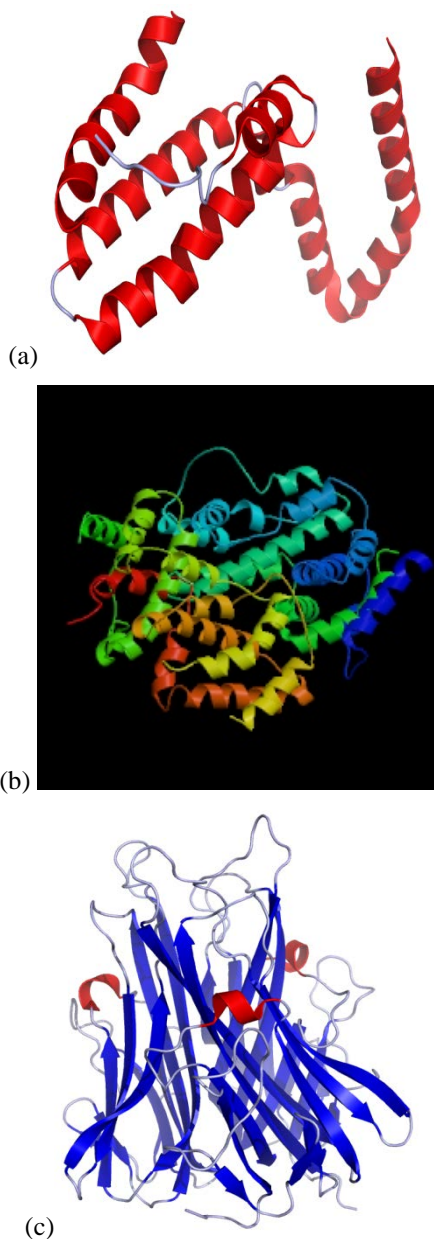
Sel T memainkan peran sentral dalam penghapusan parasit malaria stadium darah melalui pelepasan sitokin yang mengaktifkan sel efektor lainnya. Sel T helper terdiri dari dua subset, Sel T helper tipe 1 (Th- 1) yang mengaktifkan sitokin proinflamasi (IFN γ dan TNF α) dan sel T helper tipe 2 (Th- 2) menghasilkan antibodi dan sitokin anti inflamasi (IL-4, IL-5, IL-10, dan IL-13) menghambat fungsi makrofag. Masing-masing sel T menghasilkan sitokin yang mengatur perbedaan fungsi imun efektor dan bereaksi satu sama lain.

Interleukin-12 adalah sitokin kunci yang memulai respon Th1 dengan memicu produksi IFN γ dari pembunuh alami (NK) dan CD4 T cells. sekresi Interleukin-12 diinduksi oleh berbagai agen infeksi, termasuk virus, bakteri dan parasit. Selama infeksi malaria, respon non-spesifik awal kekebalan tubuh dapat ditandai dengan sekresi IL-12 dari macrophages.

TNF- α merupakan salah satu sitokin yang dihasilkan sel Th-1 yang menghambat pertumbuhan stadium darah parasit dengan mengaktifkan sistem imun seluler dan makrofag, juga dapat membunuh parasit secara langsung namun aktifitasnya lemah

Interferon adalah hormon berbentuk sitokin berupa protein berjenis glikoprotein yang disekresi oleh sel vertebrata karena akibat rangsangan biologis, seperti virus, bakteri,

protozoa, mycoplasma, mitogen, dan senyawa lainnya. Interferon gamma (IFN- γ) merupakan sitokin yang berperan dalam respon imun bawaan maupun respon imun adaptif terhadap malaria. IFN- γ akan disekresikan secara cepat oleh sel efektor seperti makrofag, monosit dan leukosit dalam memberikan perlawanan terhadap infeksi parasit malaria yang masuk kedalam tubuh. Struktur IL-12, TNF- α , dan IFN- γ dapat dilihat pada Gambar 1.



Gambar 1. Struktur tiga dimensi IL-12 (atas), IFN- γ (tengah), dan TNF- α (bawah) pada manusia.

IFN- γ merupakan salah satu sitokin proinflamasi yang disekresi sel T helper (Th1) pada saat terjadi infeksi parasit. IFN- γ sangat berperan aktif melawan infeksi parasit baik pada stadium hepatosit maupun stadium eritrosit. IFN- γ memacu sekresi *tomuor necrosis alfa* (TNF- α) untuk mengaktifkan fagosit dan juga meningkatkan daya bunuh netrofil. Pada fase *eritrositik*, eritrosit terinfeksi parasit yang pecah sewaktu proses skizogoni mengeluarkan berbagai toksin seperti *glycosylphosphatidylinositols* (GPI), hemazosin, atau mungkin antigen parasit lain seperti MSP-1, MSP-2, RAP-1. Toksin tersebut akan memicu makrofag dan limfosit T helper-1, menghasilkan berbagai sitokin proinflamasi (TNF- α , IL-1, IL-6, IL-8, IL-12, dan IFN- γ) dalam jumlah banyak, yang akan menimbulkan gangguan metabolisme sel, selanjutnya sitokin tersebut dapat memicu enzim *inducible nitric oxide synthase* (iNOS), pada sel endotel vaskuler untuk menghasilkan *Oksida nitrit* (NO). NO dihasilkan makrofag melalui aktivasi sitokin IFN- γ dan TNF- α untuk membunuh parasit bila terjadi infeksi pada stadium eritrosit (Gambar 2).

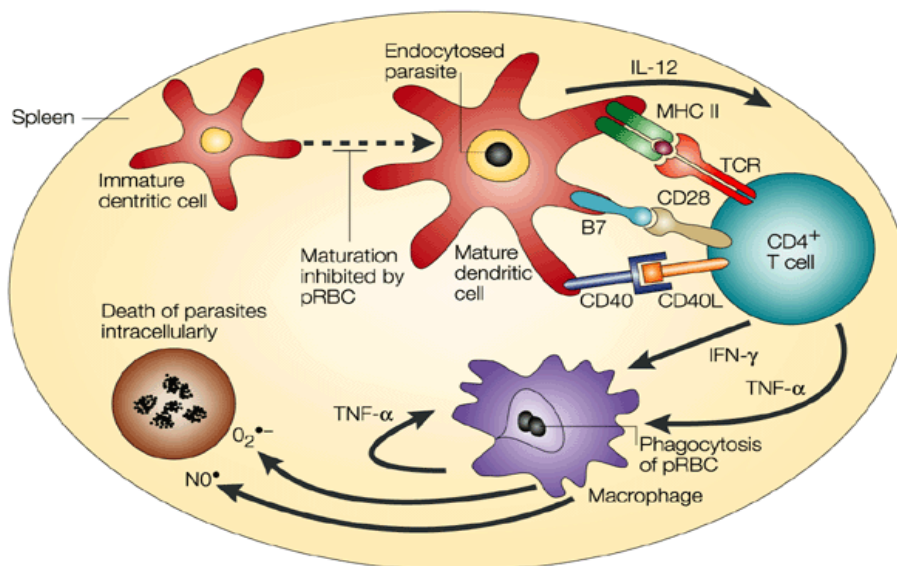
Aktivasi sel limfosit T dan sel makrofag dapat dilalukan dengan jalan imunisasi. Dengan demikian diharapkan selama infeksi malaria pada hospes yang imun akan disekresi sitokin

proinflamasi lebih besar daripada hospes yang tidak imun. Dengan meningkatnya aktivitas sel limfosit T dan sel makrofag diharapkan akan mempunyai efek proteksi selama infeksi malaria.

KULTUR SEL LIMFOSIT DAN RESPON IMUN

Kultur sel limfosit manusia atau *human peripheral blood mononuclear cells* (PBMC) secara umum digunakan untuk mempelajari respon imun terhadap Plasmodium yang menginfeksi manusia secara *in vitro*. Sel limfosit diisolasi dari darah vena dengan cara sentrifugasi gradien dengan menggunakan larutan Histopaque. Sel limfosit diresuspensi pada 1×10^6 sel/mL di medium tumbuh.

P.falciparum merupakan parasit yang paling ganas dan banyak menyebabkan mortalitas pada manusia. *P.falciparum* strain 3D7 banyak digunakan dalam penelitian dan dapat diperbanyak dengan dikultur secara kontinyu menurut metode Trager Jensens. Parasit dikultur dalam medium RPMI 1640 yang ditambahkan 25 mM HEPES dan 30 mM NaHCO₃ dan dilengkapi dengan serum manusia golongan AB 5% serta eritrosit golongan O dengan hematokrit 1%, parasit diinkubasi pada 37°C dalam *candle jar*. Bahan vaksin berupa *P.falciparum* yang



Gambar 2. Mekanisme kerja TNF- α IFN-gamma untuk sistem respon imun.

dilemahkan dengan radiasi sinar gamma.

Pengujian sitokin (IL-12, IFN γ dan TNF α) secara *in vitro*, dengan cara menambahkan sekitar 10^7 *P.falciparum* ke dalam kultur sel limfosit yang telah ditambahkan 5 ug/mL phytohaemagglutinin (PHA), kemudian diinkubasi selama 24 jam pada suhu 37°C. Respon sitokin dilihat dengan mengukur kadar sitokin dalam supernatan dengan metode uji ELISA, hasil uji dibaca dengan alat ELISA Reader pada panjang gelombang 450 nm.

RESPON SITOKIN

Pengujian respon imun terhadap manusia tidak dapat menggunakan hewan coba mencit karena parasit malaria adalah spesifik spesies. Oleh karena itu pengujian respon imun terhadap *P.falciparum* dilakukan secara *in vitro* pada kultur sel limfosit manusia. Pengujian secara *in vitro* dalam kultur sel limfosit manusia dilakukan sebagai studi awal penelitian bahan vaksin. Respon limfosit dilihat dari konsentrasi sitokin yang dikeluarkan sel sebagai respon imun terhadap keberadaan parasit.

Sel T memainkan peran sentral dalam penghapusan parasit malaria pangsung darah melalui pelepasan sitokin yang mengaktifkan sel efektor lainnya. Sitokin yang terlibat dalam kekebalan terhadap malaria tahap darah termasuk IL-12, IFN γ dan TNF α . sel T yang berkembang biak dan mengeluarkan sitokin dalam menanggapi parasit antigen dan menghambat pertumbuhan parasit dalam kultur *in vitro*. Derajat proliferasi sel mononuklear darah perifer (PBMC) diisolasi dari individu yang dirangsang dengan penambahan parasit secara *in vitro*

IFN- γ merupakan sitokin yang berperan dalam respon imun bawaan maupun respon imun adaptif terhadap malaria. IFN- γ banyak berperan dalam imunitas terhadap malaria yang berfungsi baik sebagai efektor maupun penginduksi respon imun bawaan maupun yang didapat. Respon IFN gamma dalam kultur limfosit yang di inokulasi dengan *P.falciparum* radiasi maupun tidak diradiasi dilakukan di BATAN dalam studi awal

penelitian bahan vaksin radiasi. Sel limfosit diisolasi dari darah donor manusia sehat dengan metode sentrifugasi gradien menggunakan histopak kemudian sel limfosit dikultur dalam medium komplit. *P.falciparum* radiasi maupun yang infeksius diinokulasi dengan variasi volume 25 μ l dan 50 μ l dengan penambahan 5 ug/mL phytohaemagglutinin. Setelah 48 jam inkubasi supernatan diambil untuk diukur kadar IFN- γ dengan metode ELISA.

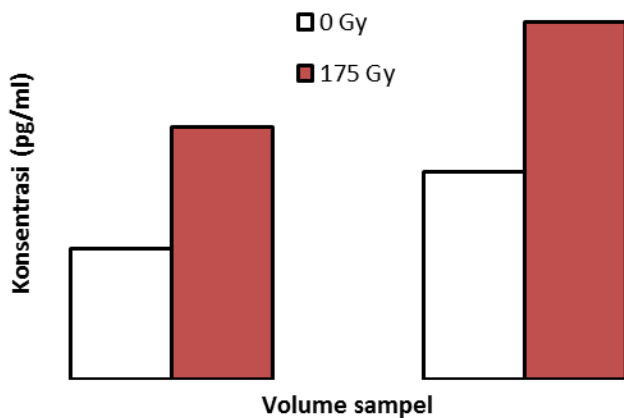
Penggunaan parasit iradiasi bertujuan untuk memeriksa aspek dari respon kekebalan tubuh manusia terhadap parasit yang diradiasi maupun yang tidak diradiasi dalam menginduksi respon sitokin awal. Setelah 24 jam paska pengkulturan dengan eritrosit terinfeksi dengan variasi volume inokulum 25 μ l dan 50 μ l dilakukan pengkulturan kembali dengan penambahan 5 ug/mL PHA dan diinkubasi kembali selama 48 jam. Setelah 48 jam inkubasi supernatan diambil untuk diukur kadar IFN- γ dengan metode ELISA. Pada penelitian ini limfosit terpacu oleh PHA yang berperan sebagai mitogen dan selanjutnya limfosit berproliferasi mensekresi sitokin.

Dari pengukuran IFN- γ dalam supernatan medium diperoleh hasil, konsentrasi IFN- γ dalam kultur sel limfosit yang diinokulasi dengan *P.falciparum* radiasi lebih tinggi dibandingkan tanpa radiasi. Berdasarkan hasil uji Turkey's terdapat perbedaan yang sangat bermakna antara kedua kelompok pada taraf signifikan di bawah 5%. Konsentrasi IFN- γ tertinggi terdapat pada medium kultur limfosit yang diinokulasi dengan 50 μ l radiasi (Gambar 3).

Dari hasil tersebut diatas membuktikan radiasi membuat mikroorganisme tidak mampu melakukan replikasi sehingga tidak menimbulkan infeksi, tetapi tetap mempertahankan sifat-sifat parasit seperti hemaglutinasi dan antigenisitas. Hilangnya kemampuan infeksi dari parasit memungkinkan untuk memproduksi bahan yang layak untuk pembuatan vaksin.

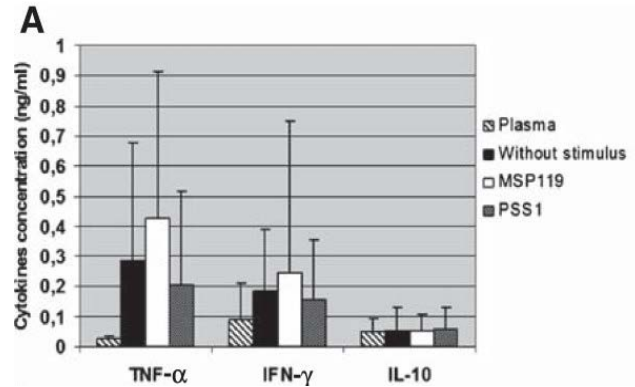
Beberapa penelitian telah melaporkan limfosit donor dan jumlah parasit yang diinokulasi mempengaruhi jumlah IFN- γ yang diinduksi. Tingkat konsentrasi IFN- γ terlihat

meningkat dengan meningkatnya parasitemia hingga 7%. Pada parasitemia tinggi, ada kemungkinan bahwa parasit dan sel limfosit bersaing untuk sumber daya, dengan efek yang merugikan pada viabilitas sel limfosit sehingga sekresi sitokinnya menurun. Pada penelitian ini membuktikan kultur limfosit yang diinokulasi dengan 50 µl *P.falciparum* memberikan sekresi IFN-γ yang lebih tinggi dibandingkan dengan 25 µl. Inokulasi dengan 50 µl *P.falciparum* dalam kultur sel limfosit menghasilkan sekresi konsentrasi IFN-γ tertinggi.



Gambar 3. Konsentrasi IFN-γ dalam kultur *in vitro* paska inokulasi *P.falciparum* iradiasi maupun yang infeksius dengan variasi volume.

Beberapa penelitian menggunakan bahan vaksin malaria berupa seluruh molekul MSP1 telah terbukti menginduksi perlindungan terhadap *P. yoelii* dan *P. falciparum*. Protein permukaan merozoit (*Merozoit Surface Protein/MSP*) adalah kandidat vaksin malaria potensial karena mereka memainkan peran penting dalam pengenalan awal dan perlekatan merozoit ke permukaan sel darah merah yang terinfeksi. Sebagai protein pada permukaan merozoit yang pertama terkena sistem kekebalan tubuh inang maka mereka dianggap target respon imun. Kebanyakan penelitian telah berfokus pada MSP1 sebagai kandidat vaksin malaria utama terhadap malaria tahap darah. Pada penelitian untuk melihat respon beberapa sitokin terhadap protein MSP1 dilakukan dengan menganalisis konsentrasi sitokin dalam supernatan pada kultur limfosit yang diukur dengan ELISA (Gambar 4)



Gambar 4. Konsentrasi TNF, IFN-γ and IL-10 sampel plasma dan supernatan kultur limfosit manusia.

Dari Gambar di atas diketahui konsentrasi sitokin tertinggi pada supernatan kultur limfosit yang diinokulasi dengan protein MSP1. Konsentrasi tertinggi yang tertinggi TNF alfa diikuti IFN gamma dan terendah IL-10. membuktikan TNF alfa berperan dalam respon awal terhadap protein MSP. TNF alfa dan IFN gamma merupakan sitokin proinflamasi.

Pada fase *eritrositik*, eritrosit terinfeksi parasit yang pecah sewaktu proses skizogoni mengeluarkan berbagai toksin seperti *glycosyl phosphatidylinositols* (GPI). Toksin tersebut akan memicu makrofag dan limfosit T helper-1, menghasilkan berbagai sitokin proinflamasi antara lain TNF-α, IL-12, dan IFN-γ yang akan menimbulkan gangguan metabolisme sel, selanjutnya sitokin tersebut dapat memicu enzim *inducible nitricoxide synthase*(iNOS), pada sel endotel vaskuler untuk menghasilkan NO. Sekresi NO untuk mengeliminasi dan membunuh eritrosit berparasit di dalam pembuluh darah. Namun pada kadar yang tinggi NO dapat berikatan dengan radikal bebas H₂O₂ membentuk pereoksinitrit yang toksik bagi sel, sehingga menimbulkan vasodilatasi berlebihan yang dapat mengakibatkan hipotensi pada malaria berat

Respon imun terhadap malaria, terutama yang melibatkan sitokin harus teregulasi dengan baik karena menentukan hidup matinya seorang penderita malaria berat. TNF-α merupakan sitokin pro-inflamasi utama dalam *innate immunity* (imunitas alamiah) yang berperan dalam

kerusakan jaringan/organ bila diproduksi dalam kadar yang tinggi. IFN-gama suatu sitokin pro-inflamasi lain yang mengaktifasi makrofag dan memiliki fungsi sangat penting dalam imunitas alamiah dan adaptif terhadap mikroba intraseluler (termasuk *Plasmodium*), diduga memegang peran sentral dalam pengaturan respon imun terhadap malaria karena mengaktifasi makrofag memproduksi TNF-a dan juga IL-10. IL-10 adalah sitokin anti-inflamasi utama dalam respon imun alamiah dan adaptif yang berperan menghentikan respon imun/ inflamasi yang berlebihan melalui inaktivasi makrofag dan sel T. Ketiga sitokin ini merupakan mediator inflamasi lokal dan sistemik dan dapat diproduksi dalam jumlah besar sehingga mudah terdeteksi dalam serum. Pada respon imun di awal infeksi malaria, sitokin proinflamasi lebih berperan dalam mengeliminasi parasit. Sitokin antiinflamasi berperan untuk menekan sekresi sitokin proinflamasi agar tidak berlebihan sehingga menimbulkan

PENUTUP

Vaksin adalah sebuah substansi yang menstimulir respon sistem imun untuk melawan suatu penyakit. Vaksin dapat dibuat dengan meradiasi mikroorganisme sehingga tidak mampu melakukan replikasi sehingga pertumbuhannya menurun, tetapi tetap mempertahankan sifat-sifat parasit seperti hemaglutinasi dan antigenisitas sehingga dapat memicu respon imun. Sel limfosit T berperan respon imunitas seluler melalui pelepasan sitokin yang mengaktifkan sel efektor lainnya untuk membunuh parasit. Sitokin yang terlibat dalam kekebalan terhadap malaria tahap darah termasuk IL-10, IFN γ dan TNF α

DAFTAR PUSTAKA

- ARSIN, A.A. 2012. Malaria Di Indonesia : Tinjauan Aspek Epidemiolog, Masagena Press. Makassar.
- BARATAWIDJAJA KG. 2006. Imunologi vaskuler dalam imunologi dasar .Edisi 7. Jakarta:BP.FKUI.p.384-428
- BARBOSA, A., NANICHE, D., APONTE, J. J., MANACA, M. N., MANDOMANDO, I., AIDE, P., SACARLAL, J., RENOM, M., LAFUENTE, S., BALLOU, W. R., ALONSO, P. L., *Plasmodium falciparum*-specific cellular immune responses after immunization with the RTS,S/AS02D candidate malaria vaccine in infants living in an area of high endemicity in Mozambique. *Infect. Immun.* 77, 4502–4509, (2009).
- CHAKRAVARTY, S., COCKBURN, I. A., KUK, S., OVERSTREET, M. G., SACCI, J. B., ZAVALA, F., CD8₊ T lymphocytes protective against malaria liver stages are primed in skin-draining lymph nodes. *Nat. Med.* 13, 1035–1041, (2007).
- CORRIGAN, R.A. and ROWE, J.A., Strain variation in early innate cytokine induction by *P. falciparum*, *Parasite Immunol*, July; 32(7): 512–527, (2010).
- Depkes RI. 2003. Epidemiologi Malaria. Direktorat Jenderal PPM-PL. Departemen Kesehatan RI. Jakarta.
- FRANKLIN, B. S., PARROCHE, P., ATAIDE, M. A., LAUW, F., ROPERT, C., DEOLIVEIRA, R. B., PEREIRA, D., TADA, M. S., NOGUEIRA, P., DA SILVA, L. H., BJORKBACKA, H., GOLENBOCK, D. T., GAZZINELLI, R. T., Malaria primes the innate immune response due to interferon- γ induced enhancement of Toll-like receptor expression and function. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 106, 5789–5794, (2009).
- GOOD, M. F., XU, H., WYKES, M., ENGWERDA, C. R., Development and regulation of cell-mediated immune responses to the blood stages of malaria: implications for vaccine research. *Annu. Rev. Immunol.* 23, 69–99, (2005).
- HARIJANTO, P., N., 2009, Pengobatan Malaria Tanpa Komplikasi (Ringan) Dalam *Malaria dari Molekuler ke Klinis*, Ed P.N., Harijanto, 2009, Penerbit Buku Kedokteran EGC, Jakarta, pp 145-155.
- HARTGERS, F. C., OBENG, B. B., VOSKAMP, A., LARBI, I. A., AMOAH, A. S., LUTY, A. J., BOAKYE, D., YAZDANBAKHS, M., Enhanced Toll-like receptor responsiveness associated with mitogen-activated protein kinase activation in *Plasmodium falciparum*-infected children. *Infect. Immun.* 76, 5149–5157, (2008).
- LJUNGSTROM I., PERLAMAM, H., SCHILCHTHERLE, M., SHERE, A., and WAHLGREEN, M., *Methods In Malaria Research*, MR4/ATCC, Manassas Virginia, 2004
- MCCALL, M. B., NETEA, M. G., HERMSEN, C. C., JANSEN, T., JACOBS, L., GOLENBOCK, D., VAN DER VEN, A. J., SAUERWEIN, R. W., *Plasmodium falciparum* infection causes proinflammatory priming of human TLR responses. *J. Immunol.* 179, 162–171, (2007).
- MCCARTHY JS, GOOD MF, Whole parasite blood stage malaria vaccines: a convergence of evidence. *Hum Vaccin* 6: 114–123, (2010).
- ROLAND, J., SOULARD, V., SELLIER, C., DRAPIER, A. M., DI SANTO, J. P., CAZENAVE, P. A., PIED, S., NK cell responses to *Plasmodium* infection and

- control of intrahepatic parasite development. *J. Immunol.* 177,1229–1239, (2006).
- SMITH, N.C., Concepts and strategies for anti-parasite immunoprophylaxis and therapy, *Int. J. For Parasite* 22 (1992)., 1047
- THOMAS C.LUKE, STEPHEN L.HOFFMAN., Rationale and plans for developing non-replicating, metabolically active, radiation attenuated Plasmodium falciparum sporozoites vaccine, *The Journal of Experimental Biology*, 206 (2003) 3803 – 3808.
- TONGREN, J. E., CORRAN, P. H., JARRA, W., LANGHORNE, J., RILEY, E. M., Epitope-specific regulation of immunoglobulin class switching in mice immunized with malarial merozoite surface proteins. *Infect. Immun.* 73, 8119–8129. *J. Immunol.* 143, 2038–2044, (2005).
- VIVIER, E., TOMASELLO, E., BARATIN, M., WALZER, T., UGOLINI, S., Functions of natural killer cells. *Nat. Immunol.* 9, 503–510, (2008).
- YOUNG, B.A., Nuclear techniques in animal agriculture, *IAEA Bul.* 23 (1981), 47.