

## UJI EFEKTIVITAS IRADIASI GAMMA LAJU DOSIS TINGGI DALAM MELEMAHKAN PARASIT *Plasmodium berghei* MELALUI INKORPORASI [<sup>3</sup>H]- HIPOKSANTIN PADA MENCIT

M. Rezky Zakiri<sup>1</sup>, Dewi Elfidasari<sup>1</sup>, Teja Kisnanto<sup>2</sup>, Mukh Syaifudin<sup>2</sup>

<sup>1</sup> Program Studi Biologi (Bioteknologi) Fakultas Sains dan Teknologi Universitas Al Azhar Indonesia, Jl. Sisingamangaraja Jakarta Pusat

<sup>2</sup> Pusat Teknologi Keselamatan dan Metrologi Radiasi, Badan Tenaga Nuklir Nasional (BATAN), Jl. Lebakbulus Raya No. 49 Jakarta Selatan

### ABSTRAK

**UJI EFEKTIVITAS IRADIASI GAMMA LAJU DOSIS TINGGI DALAM MELEMAHKAN PARASIT *Plasmodium berghei* MELALUI INKORPORASI [<sup>3</sup>H]-HIPOKSANTIN PADA MENCIT.** Indonesia termasuk negara endemis malaria. Pemerintah telah mencanangkan program pemberantasan penyakit mematikan ini antara lain melalui pengembangan vaksin. Vaksin untuk *protozoa* pada umumnya adalah vaksin aktif yang dapat dibuat dengan radiasi sinar gamma untuk melemahkan mikroorganisme target. Efektivitas sinar gamma dalam melemahkan parasit pada umumnya diketahui dengan cara mikroskopis, akan tetapi cara ini memiliki kelemahan sehingga dikembangkan uji viabilitas melalui inkorporasi hipoksantin berlabel tritium. Darah mencit terinfeksi parasit *P. berghei* ( $10^6 - 10^7$  parasit/ml) yang telah diiradiasi gamma dosis 0 Gy, 150, 175, 200 dan 250 Gy pada laju dosis 740 Gy/jam masing-masing dicampur dengan 2  $\mu$ Ci [<sup>3</sup>H]-hipoksantin dan diinokulasikan secara intraperitoneal pada masing-masing kelompok mencit. Dua hari kemudian dilakukan pengambilan sampel darah dari ekor dan dibuat apusan darah tipis untuk pengamatan mikroskopis, dan sebagian yang lain (10  $\mu$ l) untuk uji viabilitas berbasis inkorporasi hipoksantin dengan mencacah menggunakan *Liquid Scintillation Counter* (LSC). Diketahui dosis 175 Gy merupakan dosis optimal dalam melemahkan parasit berdasarkan nilai aktivitas tritium. Hasil pengamatan mikroskopis juga mendukung hal tersebut.

**Kata kunci:** malaria, vaksinasi, iradiasi gamma, inkorporasi [<sup>3</sup>H]-hipoksantin

### ABSTRACT

**TEST ON THE EFFECTIVENESS OF GAMMA IRRADIATION AT HIGH DOSE RATE IN ATTENUATING *Plasmodium berghei* PARASITES BASED ON INCORPORATION OF [<sup>3</sup>H] HYPOXANTHINE IN MOUSE.** Indonesia is a malaria endemic country. The government is intended to pursue the elimination program of this deadly disease through development of vaccine. Vaccine for *protozoa* in general is active vaccine that can be created by using gamma rays to attenuate microorganisms as target. Effectivity of gamma rays in attenuating parasit can be obtained through microscopic observation, however this technique has a weakness so viability test based on tritium labeled hypoxantine incorporation was developed. Mouse blood infected with *P. berghei* ( $10^6 - 10^7$  parasites/ml) that already irradiated with gamma rays at dosies of 0 Gy, 150, 175, 200 and 250 Gy at dose rate of 740 Gy/hour was each mixed with 2  $\mu$ Ci of [<sup>3</sup>H]-hypoxantine and then were inoculated intraperitoneally to each group of mice. Two days later blood samples from tail of mouse were taken and thin blood smear were made for microscopic observation, and other part of blood (10  $\mu$ l) for viability assessment based on the hypoxantine incorporation by counting with *Liquid Scintillation Counter* (LSC). It was known that dose of 175 Gy was the optimal dose to attenuate parasit based on value of tritium activity. Result of microscopic observation also support this case.

**Keyword:** malaria, vaccination, gamma irradiation, incorporation of [<sup>3</sup>H]-hypoxantine

### I. PENDAHULUAN

Malaria merupakan penyakit mematikan dan menjadi permasalahan kesehatan utama di dunia. Jumlah kasus malaria di Indonesia termasuk ke dalam kategori tinggi, terutama di

Indonesia bagian timur [1]. Berdasarkan data Riset Kesehatan Dasar menunjukkan bahwa pada tahun 2011 terdapat 374 kabupaten endemis malaria di Indonesia dengan jumlah penduduk lebih dari 90 juta [2]. Malaria

diakibatkan oleh infeksi parasit. *Plasmodium* yang menginfeksi manusia memiliki kemiripan secara morfologi, genetik, dan siklus hidup dengan *plasmodium* yang menginfeksi hewan seperti rodensia [3]. Oleh karena itu penelitian mengenai aspek parasitologi dan imunologi termasuk pengembangan vaksin malaria banyak dilakukan dengan menggunakan hewan model rodensia dan mencit [4].

Penyebaran penyakit malaria dapat dikendalikan melalui beberapa cara, antara lain pengendalian dengan vaksinasi yang dilakukan dengan melemahkan parasit melalui iradiasi gamma. Vaksin aktif pada umumnya digunakan pada penyakit yang disebabkan oleh *protozoa*, seperti parasit malaria. Pembuatan vaksin aktif dapat dilakukan dengan memanfaatkan sinar gamma untuk melemahkan organisme target [5]. Teknik ini lebih efektif melemahkan parasit sehingga meningkatkan respon imun dibandingkan dengan teknik konvensional seperti pemanasan dan kimia. Iradiasi gamma parasit dapat menghasilkan immunogen yang mampu memproduksi antibodi untuk menahan serangan infeksi parasit malaria [6].

Dosis iradiasi merupakan faktor yang mempengaruhi daya pelemahan parasit. Hasil penelitian sebelumnya menunjukkan bahwa dosis iradiasi gamma 75 sampai 125 Gy belum dapat melemahkan parasit, sedangkan dosis 150 hingga dosis 175 merupakan dosis optimal untuk melemahkan parasit *P. berghei* pada laju dosis 380 Gy/jam [7]. Namun demikian belum diketahui informasi terkait dosis iradiasi gamma yang efektif dalam melemahkan parasit (*P.*

*berghei*) melalui inkorporasi [<sup>3</sup>H] Hipoksantin pada mencit pasca iradiasi dengan laju dosis lebih tinggi (740 Gy/jam).

Metode kultur *Plasmodium* terus dikembangkan untuk studi kemoterapi dan imunologi antara lain dengan menggunakan hipoksantin [8]. Hipoksantin merupakan senyawa biologis yang termasuk ke dalam golongan purin dan berperan sebagai penyusun basa pada nukleotida inosin monofosfat (IMP). IMP merupakan *intermediate* awal dalam sintesis purin. Sintesis IMP akan membentuk adenosin monofosfat (AMP) dan guanosis monofosfat (GMP) [9]. AMP berperan dalam pelepasan energi untuk digunakan oleh sel [10]. Dengan demikian [<sup>3</sup>H]-Hipoksantin dapat dijadikan sebagai cara uji viabilitas parasit karena hipoksantin memiliki peranan penting dalam biosintesis nukleotida *plasmodium*.

Tujuan penelitian adalah menguji efektivitas iradiasi gamma dalam melemahkan parasit *P. berghei* pada hewan model mencit melalui uji inkorporasi hipoksantin pada mencit sebagai uji praklinis pengembangan vaksin malaria.

## II. BAHAN DAN METODE

Sekelompok mencit Swiss Webster (15 ekor) berumur kurang lebih 2 bulan dibagi ke dalam 5 kelompok, masing-masing terdiri dari 3 mencit, dipelihara dalam kandang plastik dengan tutup kawat dan alas kandang berupa serutan sekam kayu dan diberikan makanan pelet dan minuman *ad libitum*. Darah terinfeksi parasit *P. berghei* strain ANKA ( $10^6 - 10^7$  parasit/ml) diiradiasi

gamma pada dosis 0 Gy, 150, 175, 200 dan 250 Gy menggunakan Irradiator Gamma Cell 220 (IRPASENA) dari sumber Co-60 dengan laju dosis iradiasi 740 Gy/jam.

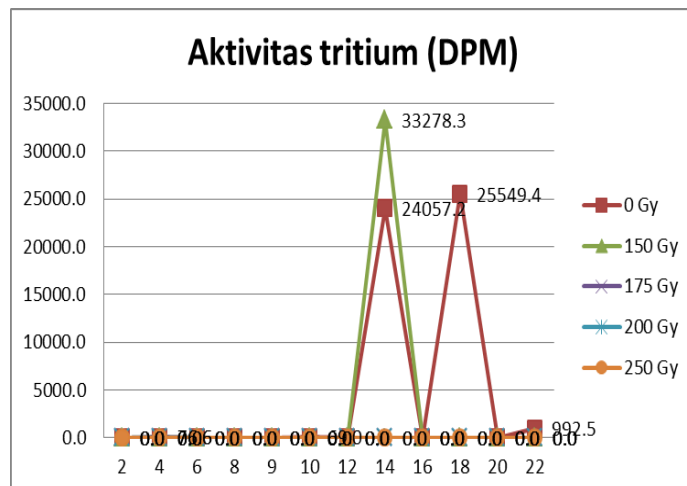
Masing-masing darah yang telah diiradiasi tersebut selanjutnya dicampurkan dengan 2  $\mu\text{Ci}$  [ $^3\text{H}$ ]-Hipoksantin (Amersham) dan kemudian diinokulasikan secara intraperitoneal (IP) pada masing-masing kelompok mencit. Dua hari kemudian dilakukan pengambilan sampel darah dari ekor dan dibuat apusan darah tipis untuk pengamatan mikroskopis, dan sebagian yang lain (10  $\mu\text{l}$ ) dicampurkan dengan 3 ml air dalam tabung scintilasi dan ditambahkan 12 ml larutan scintilasi (Perkin Elmer). Untuk pengamatan mikroskopis dihitung jumlah sel eritrosit yang terinfeksi parasit dari sejumlah 2000 sel eritrosit total. Untuk uji viabilitas berbasis inkorporasi hipoksantin, campuran dicacah menggunakan *Liquid Scintillation Counter* (LSC) selama 1 jam. Pengambilan sampel ini diulangi setiap 2-3 hari sekali hingga 22 hari pasca inokulasi.

### III. HASIL DAN PEMBAHASAN

#### Pengujian efek iradiasi

Dalam penelitian ini, aktivitas tritium digunakan untuk mengetahui viabilitas parasit pasca iradiasi gamma. Viabilitas parasit di dalam sel darah sangat penting dalam pengembangan vaksin aktif yang dilemahkan dengan sinar gamma [11]. [ $^3\text{H}$ ]-Hipoksantin menjadi cara uji viabilitas parasit yang dianggap akurat karena hipoksantin memiliki peranan

penting dalam biosintesis nukleotida *Plasmodium* yang terkait dengan perkembangan sel.



Gambar 1. Kurva aktivitas tritium pada hari-hari pasca penyuntikan

Hasil perhitungan aktivitas tritium menunjukkan bahwa pertumbuhan parasit yang diiradiasi 0 Gy mulai terjadi pada hari ke 12, kemudian menurun dan berfluktuasi dari hari ke 14 hingga hari ke 22. Pada dosis iradiasi 150 Gy, viabilitas parasit teramati pada hari ke 4 dan 16. Nilai aktivitas tritium pada dosis 150 Gy sangat berbeda dengan dosis 0 Gy yang diakibatkan dosis radiasi yang optimum dapat merusak DNA parasit dan menyebabkan mikroorganisme tidak dapat melakukan replikasi sehingga tidak menimbulkan infeksi. Virulensi parasit salah satunya ditentukan oleh daya multiplikasi parasit dan daya invasi parasit [12]. Infeksi parasit yang telah dilemahkan tersebut dapat dieliminasi oleh respon imun yang muncul sebagai respon imun terhadap infeksi. Proses patologi parasit sangat dipengaruhi oleh siklus eritrositik. Di dalam siklus eritrositik ini densitas

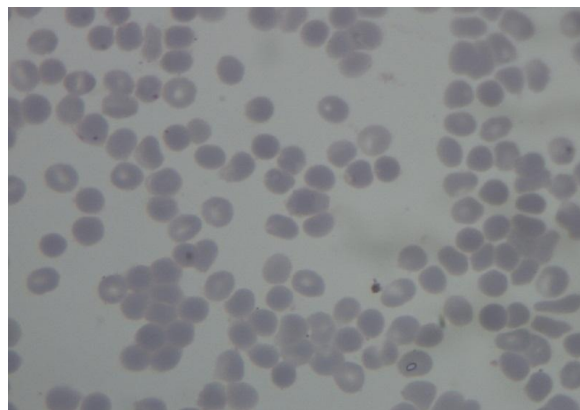
parasit akan terus meningkat hingga inang mati atau mengaktifkan sistem imun untuk melawan parasit [13].

Hasil uji aktivitas tritium menunjukkan bahwa laju dosis juga mempengaruhi pertumbuhan parasit. Resistensi melawan infeksi malaria pada mencit berbanding lurus dengan besar dosis iradiasi dan jumlah dosis imunisasi sehingga laju dosis 740 Gy/jam merupakan laju dosis yang cukup tinggi bagi parasit, sehingga pertumbuhan parasit tidak maksimal [14].

Penentuan viabilitas parasit melalui penentuan nilai aktivitas tritium pada dosis iradiasi 175 Gy hanya muncul pada hari ke 4. Laju dosis yang tinggi mengakibatkan parasit menjadi sangat lemah dan bahkan mati. Iradiasi gamma dosis 200 dan 250 tidak menunjukkan adanya nilai aktivitas tritium yang menandakan kematian parasit. Tidak adanya nilai aktivitas tritium pada sampel membuktikan bahwa parasit tidak dapat bertahan hidup pasca iradiasi dosis 200 dan 250 Gy. Berdasarkan hasil nilai aktivitas tritium dapat disimpulkan bahwa dosis 175 Gy pada laju dosis 740 Gy/jam merupakan dosis optimal dalam melemahkan *P. berghei*. Aktivitas tritium pada dosis 175 Gy masih dapat terlihat pada hari ke 16 dan kemudian menurun dan tidak muncul kembali hingga hari ke 24. Hasil pada dosis 150 Gy dapat digunakan sebagai dosis optimal pembuatan vaksin karena iradiasi dapat merusak DNA, membuat mikroba tidak dapat bereplikasi sehingga menurunkan daya infeksi patogen tersebut [15].

Hasil pengamatan mikroskopis menunjukkan bahwa tidak terdeteksi adanya

parasit atau jumlahnya sangat rendah pada pengamatan apusan darah tipis terutama untuk parasit diiradiasi 175 Gy (Gambar 2). Untuk semua dosis iradiasi, terutama 200 dan 250 Gy pada laju dosis tinggi ternyata mematikan parasit sebelum disuntikkan ke tubuh mencit.



**Gambar 2. Tampilan mikroskopis apusan darah tipis pasca iradiasi gamma dosis 175 Gy pada hari ke 18 (tidak teramati adanya parasit atau parasitemia sangat rendah).**

Pada penelitian ini radiasi gamma digunakan untuk melemahkan parasit sebagai bahan vaksin. Pada dasarnya radiasi secara teknik merupakan proses sederhana yang mempertahankan sifat struktural mikroorganisme patogen tanpa menghancurkan antigen alamiah. Oleh karena itu suatu respon imun yang kuat dapat terbentuk pada inang yang diberi vaksin. Radiasi memiliki ciri khusus karena memiliki kemampuan untuk melakukan penetrasi sel, jaringan dan memberikan energi pada benda yang terpapar olehnya dalam bentuk ionisasi [16].

Paparan radiasi dapat menimbulkan efek pada virus, protozoa, bakteri dan lain – lain

yakni kerusakan DNA dan menyebabkan mikroorganisme tidak dapat melakukan replikasi sehingga tidak menimbulkan infeksi. Hilangnya kemampuan infeksi parasit memungkinkan untuk mendapatkan bahan untuk pembuatan vaksin. Terdapat beberapa faktor yang dapat mempengaruhi proses perolehan bahan tidak aktif dari mikroorganisme ini, seperti jenis radiasi, dosis dan laju dosis radiasi itu sendiri [17].

Viabilitas parasit merupakan hal sangat penting dalam pengembangan vaksin *life-attenuated* dengan sinar gamma [11]. Hal ini meliputi pengamatan invasi terhadap sel darah merah dan untuk mengetahui tahapan perkembangan parasit secara *in vitro* maupun *in vivo* dapat digunakan suatu senyawa berlabel isotop [18]. Perkembangan sistem kultur *in vitro* *P. falciparum* pun telah berlangsung cepat terutama untuk uji obat anti malaria [19]. Uji tradisional ini biasanya meliputi inkubasi eritrosit terinfeksi selama waktu tertentu dengan perlakuan obat. Selanjutnya senyawa bertanda seperti hipoksantin ditambahkan dan diinkubasi kembali selama 24 jam. Inkorporasi dari radioaktivitas ke dalam biopolimer parasit digunakan sebagai indeks proliferasi sel. Keunggulan uji *in vitro* ini adalah kemudahan dan sensitivitasnya [20]. Sedangkan untuk pengembangan vaksin masih belum banyak dilakukan.

#### IV. KESIMPULAN

Laju dosis iradiasi 740 Gy/jam mempengaruhi kemampuan parasit untuk bertahan hidup sehingga dosis optimal dalam melemahkan parasit sulit diketahui. Akan tetapi berdasarkan hasil uji inkorporasi hipoksantin dan pengamatan mikroskopis, diketahui dosis 175 Gy merupakan dosis optimal dalam melemahkan parasit.

#### DAFTAR PUSTAKA

1. HISWANI, *Gambaran penyakit dan vektor malaria di Indonesia*. Sumatera Utara : Fakultas Kesehatan Masyarakat Universitas Sumatera Utara, 2004.
2. ANONIMUS. *Estimasi Nasional Infeksi HIV pada Orang Dewasa Indonesia Tahun 2002*, Departemen Kesehatan RI, Jakarta, 2002.
3. WARDIARTO, *Parasitologi Biologi Parasit Hewan*, Gajah Mada University Press, Yogyakarta, (1989).
4. DARLINA dan TETRIANA D. 2006. Pengaruh irradiasi gamma pada *Plasmodium berghei* terhadap daya tahan mencit. [PTKMR-BATAN]. [http://www.batan.go.id/ptkmr/Biomedika/Publikasi%202006/Devita-2006\(Kode%20II.K12.2.06\).pdf](http://www.batan.go.id/ptkmr/Biomedika/Publikasi%202006/Devita-2006(Kode%20II.K12.2.06).pdf) [21 Juli 2012]
5. ANONYMOUS, *Parasite control*, Nature reviews/immunology. Nature publishing group, 2005.

6. HOFFMAN S.L., GOH, M.L., LUKE, T.C., Protection of humans against malaria by immunization with radiation-attenuated *Plasmodium falciparum* sporozoites. *Journal of Infectious Diseases* 185:1155–1164, 2002.
7. DARLINA, TETRIANA, D., Studi awal pengembangan vaksin malaria dengan teknik nuklir : Pengaruh Iradiasi gamma pada plasmodium berghei terhadap daya tahan mencit. Seminar nasional sains dan teknologi PTNBR – BATAN : Bandung, 17 -18 Juli 2007.
8. CHULAY, J.D., HAYNES, D., CARTER, L., *Plasmodium falciparum* : Assesment of in vitro growth by [<sup>3</sup>H] Hypoxantine incorporation. *Experimental parasitology* 55, 138 – 146, 1983.
9. NURINGTYAS, T.R., *Metabolisme asam nukleat dan nukleotida*. E-learning universitas gajah mada, 2010.
10. SHERMAN, I.W., , Purine and pyrimidine metabolism of asexual stages, In: *Malaria Parasites Biology Pathogenesis and Protection*, Irwin W. Sherman (Ed.), ASM Press, Washington D.C., 1998, pp. 177-184.
11. MADRID, D.C., TING, L M., WALLER, K.L., [SCHRAMM](#), V.L., KIM, K., *Plasmodium falciparum* Purine Nucleoside Phosphorylase Is Critical for Viability of Malaria Parasites, *Journal of Biological Chemistry*, 283, 35899-35907, 2008.
12. LANDAU, J., BOULARD, Y., Lifecycles and morphology, In: *Rodent Malaria*, R Killick -Kendrick (Ed.), Academic Press, London, 53–157, 1978.
13. TAMBAYONG E H. *Patobiologi malaria dalam Harijanto P N. (Ed) Malaria: Epidemiologi, Patogenesis, Manifestasi klinis dan Penanganannya*. 2000. Jakarta : kedokteran EGC.
14. WELLDE, B.T. and SADUN, E.H., 1967. Resistance produced in rats and mice by exposure to irradiated *Plasmodium berghei*, *Experimental parasitology* 21, 310-324.
15. ANONYMOUS, Using gamma radiation preserves T-cell responses in bacterial vaccine, *Medical Research News*. [http://health.ucsd.edu/news/2006/07\\_25\\_Raz.htm](http://health.ucsd.edu/news/2006/07_25_Raz.htm). Retrieved in July (2006).
16. BENNETH, C., THATCHER, S., TOLMAN-HULSBURG, J., POWERS, M., MILWADM, H., NIELSEN, D., TENG, D.H.F., Comparison of gamma irradiated and triazol-treated RNA viruses using the joint biological agent identification and diagnostic, *Idaho Technology Inc*. Salt Lake City, 2002.
17. HALL, E.J., *Radiobiology for the radiobiologist*, Lippincott Williams and Walkin, Philadelphia, 1994.
18. MALAGON, F. and CASTILLO, O.G., On the labeling of malaria parasites *in vivo* with 3H-hipoxanthine while developing an infection in the mouse, *Acta Protozoologica* 39, 281-288, 2000.
19. OKIRO, E., HAY, S., GIKANDI, P., SHARIF, S., NOOR, A., PESHU, N., MARSH, K., and SNOW, R., The decline

- in paediatric malaria admissions on the coast of Kenya. *Malaria Journal*, 15;6 (1), 151-155, 2007.
20. **ASAHI, H. and KANAZAWA, T.** Continuous cultivation of intrerythrocytic *Plasmodium falciparum* in a serum-free medium with the use of a growth-promoting factor. *Parasitology* 109, 397-401, 1994.
- TANYA JAWAB**  
**Penanya : Fadil Nazir**  
Pertanyaan :  
Mengapa pada dosis 0 gy terjadi penurunan pada hari ke 16 lalu naik drastis pada hari ke 18?  
Jawaban :  
Hal yang mungkin terjadi adalah parasit *Plasmodium berghei* mengalami fase dorman namun untuk memastikannya diperlukan pengamatan parasitemia. Mikroskopis dalam organ dalam.