

Efek Vaksinasi Berulang *Plasmodium berghei* Radiasi dalam Menginduksi Kekebalan Humoral dan Proteksi pada Mencit (*Mus musculus*) Swiss Webster

The Effect of Booster Vaccine Plasmodium berghei Radiation in Inducing Humoral Immune and Protection Mice (Mus musculus) Swiss Webster

Darlina Yusuf*, Tur Raharjo, Teja Kisananto, Siti Nurhayati

Pusat Teknologi Keselamatan dan Metrologi Radiasi - Badan Tenaga Nuklir Nasional (BATAN)
Jl. Lebak Bulus Raya No. 49, Jakarta 12440, Indonesia

* e-mail : darlina@batan.go.id

ABSTRAK

Radiasi gamma dapat digunakan untuk melemahkan parasit. Parasit yang lemah memberikan kesempatan bagi inangnya untuk mengembangkan respon imun yang mampu mengatasi penyakit paska infeksi. Antibodi merupakan komponen kekebalan tubuh yang berperan dalam respon imun humoral. Tujuan dari penelitian ini adalah untuk mengetahui pengaruh imunisasi berulang dan ujiantang terhadap respon antibodi dan pertumbuhan parasit. Penelitian ini menggunakan rancang acak dengan 60 ekor mencit Swiss Webster yang dibagi menjadi 3 kelompok dan dilakukan selama 62 hari. Dosis radiasi yang digunakan adalah 150 Gy, 175 Gy, dan kontrol positif (0 Gy), dosis imunisasi dengan 1×10^7 parasit diradiasi per ml. Imunisasi ulang dilakukan 1 dan 2 minggu setelah imunisasi pertama. Ujiantang dilakukan satu bulan setelah imunisasi pertama. Pertumbuhan parasit diamati setiap dua hari dan pengamatan respon antibodi diamati pada hari ke - 8, 15, 40, 47, dan 62. Hasil yang diperoleh adalah, konsentrasi antibodi mencit diimunisasi dengan dosis 175 Gy meningkat hingga 3 kali setelah imunisasi kedua, pertumbuhan parasit relatif rendah, dan 60% mencit tetap sehat hingga hari ke 62. Dapat disimpulkan bahwa imunisasi ulangan *P. berghei* yang diradiasi 175 Gy dapat meningkatkan konsentrasi antibodi, menekan pertumbuhan parasit, mencegah manifestasi gejala klinis dan mencit tetap sehat sampai hari ke - 62.

Kata kunci: Antibodi, *P. berghei*, respon imun, sinar gamma, ujiantang

ABSTRACT

Gamma radiation can be used to attenuate the parasite. Weak parasite provides an opportunity for the host to develop an adaptive immune response which is capable to reduce the risk of disease post-infection. The immune system against malaria parasites involves humoral and cellular components. Antibodies are one amongs the humoral components of immune system. The purpose of this study was to determine the effect of repeated immunization and challenge test on the antibody response and the growth of parasites *in vivo*. Conducted over 62 days period, this study used a randomized design with 60 Swiss Webster mice which were divided into three groups and. The radiation dose was set at 0 (positive control), 150, and 175 Gy. Immunization dose was set at 1×10^7 irradiated parasites per ml. Repeated immunization was performed sequentially at 1 and 2 weeks after the first immunization. Challenge test carried out at one month after the first immunization. Parasitic growth was observed every two days, while the observation of antibody responses was observed on days 8, 15, 40, 47, and 62, respectively. The results showed that the treatment of 175 Gy caused threefold increases in the concentration of antibodies after the second immunization in which parasite growth was relatively low, and 60% of mice population remained healthy until day 62. It can be concluded that the repeated immunization using irradiated *P. berghei* at dose of 175 Gy can increase the concentration of antibody, suppresses the growth of parasites, prevent the manifestation of clinical symptoms and the mice remained healthy until day of 62.

Keywords: Antibodies, *P. berghei*, immune response, gamma rays, challenge test

PENDAHULUAN

Penyakit malaria disebabkan oleh parasit protozoa dari genus *Plasmodium*. Saat ini malaria masih menjadi endemik pada beberapa daerah tropis terutama daerah sub-tropis di Asia, Afrika, Amerika Selatan dan Tengah. Sekitar setengah dari populasi dunia (3,3 miliar orang) berada pada risiko malaria di lebih dari 100 negara [1]. Upaya mengontrol infeksi *Plasmodium falciparum* terus menjadi beban kesehatan utama bagi jutaan orang di negara-negara tropis. Indonesia masih menjadi endemik malaria dan menyebar hampir di seluruh pulau dengan derajat endemisitas yang berbeda [1], [2]. Di daerah endemisitas, kekebalan terhadap malaria secara bertahap diperoleh dari paparan parasit secara berulang. Kekebalan yang diperoleh ini cepat menurun. Hal ini menunjukkan bahwa kekebalan berumur pendek dan butuh pemeliharaan yang secara konstan ditingkatkan untuk itu diperlukan vaksinasi [3]. Pelemahan mikroorganisme patogen adalah strategi untuk pengembangan vaksin sejak pertama kali ditemukan oleh Louis Pasteur [4].

Radiasi gamma (γ) dapat digunakan untuk menonaktifkan mikroorganisme untuk persiapan vaksin selain metode inaktivasi pemanasan atau kimia [5]. Tujuan dari radiasi γ untuk parasit stadium darah adalah untuk melemahkan parasit untuk persiapan bahan vaksin. Parasit yang lemah memberikan kesempatan bagi inangnya untuk mengembangkan respon imun yang mampu mengatasi penyakit paska infeksi. Parasit yang masuk ke dalam tubuh akan dihadapi sistem kekebalan tubuh. Reaksi respon kekebalan inang terhadap infeksi malaria sangat kompleks karena melibatkan hampir semua komponen dari sistem kekebalan tubuh baik kekebalan humoral dan seluler yang timbul baik secara alami atau diperoleh sebagai akibat dari imunisasi [6]. Parasit yang masuk ke dalam darah segera dihadapi oleh respon imun non-spesifik dan kemudian oleh respon imun spesifik. Respon imun terhadap imunisasi meliputi respon kekebalan humoral yang dimediasi antibodi dan imunitas seluler yang diperankan oleh limfosit T. Respon kekebalan humoral dapat diketahui dari antibodi yang disekresi [6], [7]. Pada penelitian malaria sebelumnya, dosis iradiasi gamma yang optimal untuk melemahkan parasit sebagai bahan vaksin dengan menggunakan model *P. berghei* stadium eritrositik dievaluasi terhadap infeksi parasit

berdasarkan periode prepaten, persentase parasitemia, dan kematian mencit. Hasil penelitian menyatakan bahwa dosis 150-175 Gy adalah rentang dosis optimal untuk sinar γ dalam menghambat *P. berghei* tahap eritrositik ditandai dengan pemanjangan periode prepaten, parasitemia rendah dan daya tahan hidup yang panjang [8], [9].

Imunitas humoral untuk malaria bersifat sementara dan tidak bertahan dalam waktu yang lama sehingga diperlukan imunisasi ulangan [7]. Dalam penelitian ini, akan dievaluasi respon imun jangka panjang dan kemampuan parasit untuk mengatasi infeksi setelah ujiantang. Respon imun dievaluasi dengan menghitung konsentrasi antibodi dalam serum. Efek proteksi dievaluasi dengan memantau pertumbuhan parasit dan eritrosit secara berkala.

BAHAN DAN METODE

Bahan vaksin

P. berghei strain ANKA diiradiasi pada dosis 150 dan 175 Gy menggunakan Cobalt 60 sumber di fasilitas Irradiator "IRPASENA", Pusat Aplikasi Isotop dan Radiasi - BATAN.

Hewan percobaan

Mencit strain *Swiss Webster* jantan, berusia 8-10 minggu, bobot sekitar 30-35 g yang dibeli dari Departemen Kesehatan di Jakarta. Pemeliharaan hewan dalam kandang fiber glas dengan tutup *stainless steel* dan diberi makanan pelet dan minuman *ad libitum* [1], dikarantina selama 7 hari sebelum digunakan. Mencit dibagi menjadi 3 kelompok yaitu mencit yang diinfeksi parasit tidak diiradiasi (kelompok 0 Gy), mencit divaksin dengan parasit diiradiasi 150 Gy (kelompok 150 Gy) dan 175 Gy (kelompok 175 Gy), setiap kelompok perlakuan digunakan 20 tikus.

Imunisasi, booster dan ujiantang

Kelompok mencit 0 Gy disuntik dengan $\pm 1 \times 10^7$ parasit infeksius sebanyak 0,3 ml secara intraperitoneal. Kelompok 150 Gy dan 175 Gy divaksinasi dengan menyuntikkan parasit diiradiasi dengan volume dan jumlah yang sama dengan kelompok 0 Gy. Imunisasi kedua (penguat) dilakukan satu minggu setelah imunisasi pertama. Imunisasi ketiga dilakukan satu minggu setelah imunisasi kedua dengan parasit diiradiasi dengan

jumlah yang sama. Uji tantang dilakukan pada hari ke-31 dengan menyuntikkan sebanyak 1×10^5 parasit infeksius. Pengamatan parasitemia dan eritrosit dilakukan setiap 2 hari sampai hari 62 setelah infeksi. Respon imun dilakukan pada hari ke-8, 15, 40, 47, dan 62 setelah imunisasi pertama.

Pengamatan pertumbuhan parasit dan hematologi

Sepuluh mikroliter (μL) darah perifer diambil dari tikus ekor akhir. Dua mikroliter darah dilarutkan dalam 198 μL larutan Hayem untuk menghitung jumlah eritrosit. Pemeriksaan dan penghitungan sel dilakukan di bawah mikroskop perbesaran 40x dengan menggunakan kamar Neubauer dan dihitung dengan rumus:

$$\sum \text{eritrosit (mm}^3) = \frac{\sum \text{sel} \times \text{Faktor Pengenceran}}{0.0025 \text{ mm}^2 \times 0.1 \text{ mm}}$$

Enam mikroliter darah dibuat apusan tipis kemudian difiksasi dengan metanol dan diwarnai dengan larutan Giemsa 10% selama 30 menit setelah itu dicuci dengan air. Pemeriksaan dan penghitungan sel dilakukan di bawah mikroskop perbesaran 100 X. Parasitemia adalah kepadatan sel darah terinfeksi parasit pada ± 5000 sel darah merah atau 10 bidang pandang dapat dihitung dengan rumus [2];

$$\frac{\sum \text{eritrosit yang terinfeksi parasit} \times 100\%}{\sum \text{total eritrosit}}$$

Persentase proteksi pada mencit dihitung dari jumlah mencit yang terproteksi dibagi jumlah mencit yang disuntik dengan *P. berghei* infeksius.

Pengukuran antibodi

Pada hari ke-8, 15, 40, 47, dan 62 pasca-infeksi, serum dikumpulkan dengan mengambil darah dari fungsi jantung dari kelompok mencit perlakuan kontrol, 150 Gy dan 175 Gy. Darah

disentrifugasi untuk memisahkan serum dari sel-sel darah.

Pengukuran kadar antibodi (*imuno gamma globulin* atau IgG) dengan metode ELISA. Antibodi (IgG) diukur dengan standar *Sandwich enzyme-linked immunosorbent assay* (ELISA). Sumuran ELISA yang dilapisi dengan 100 μL antibodi diinkubasi semalam di 4°C . Lempeng diblokir dengan PBS yang mengandung 1% susu kering tanpa lemak dan diinkubasi selama 2 jam. Setelah proses pencucian ditambahkan larutan standar dan sampel pada sumuran kemudian ditambahkan reagen pendeteksi dan diinkubasi selama 3 jam agar IgG terikat dengan Antibodi sekunder terbiotinilasi untuk anti-IgG kemudian dicuci lalu ditambahkan peroksidase streptavidin dan reaksi dihentikan dengan penambahan *stop solution*. Absorbansi dibaca dengan *ELISA reader* pada panjang gelombang 450 nm [3].

Analisa data

Data hasil penelitian dianalisa menggunakan program Medcalc. Uji normalitas data ditentukan dengan uji *Kolmogorov-Smirnov one sample test*. Pada data non parametrik, perbandingan dua grup menggunakan *Mann-Whitney U test*. Data dipresentasikan dengan nilai rata-rata \pm SD, sebagai data individual. Data konsentrasi ELISA berupa logaritmik kemudian ditransformasikan ke data normal. Pada data parametrik, perbandingan dua grup menggunakan *unpaired t test*. Pada semua pengujian, berbeda signifikan jika nilai $p \leq 0,05$.

HASIL DAN PEMBAHASAN

Evaluasi kinetika produksi antibodi setelah imunisasi berulang dan uji tantang dilakukan untuk mengetahui respon kekebalan mencit pasca imunisasi dengan *P. berghei* radiasi. Evaluasi dilakukan dengan metode ELISA. Tingkat antibodi dalam serum diukur dari sampel darah yang diambil dari fungsi jantung (Tabel 1).

Tabel 1. Konsentrasi antibodi setelah imunisasi pertama, kedua dan ketiga serta uji tantang pada kelompok mencit kontrol, 150 Gy dan 175 Gy

Pengambilan Sampel	Konsentrasi Antibodi ($\mu\text{g/mL}$)		
	Kontrol	150 Gy	175 Gy
Hari ke-1	$32,6 \pm 4,5$	$23 \pm 5,3$	$16,8 \pm 2,3$
Hari ke-8	$106,07 \pm 17$	$146,9 \pm 15,4$	$57,4 \pm 9,3$
Hari ke-15	$70,4 \pm 12,3$	$118,3 \pm 7,3$	$148,9 \pm 15,2$
Hari ke-40			$43,6 \pm 15,4$
Hari ke-47			$89 \pm 15,5$
Hari ke-62			$152,9 \pm 14,6$

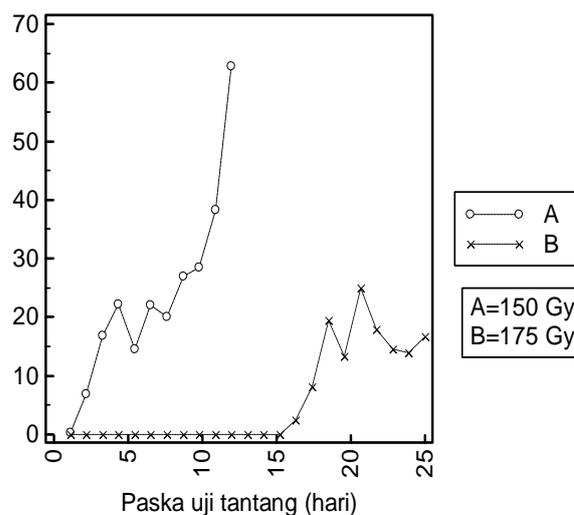
Konsentrasi antibodi dalam serum setelah imunisasi pertama masih rendah. Setelah imunisasi kedua di hari 8, tingkat respon antibodi (IgG) meningkat 3 kali lipat disemua mencit perlakuan. Konsentrasi IgG paling tinggi pada mencit perlakuan 150 Gy sedangkan konsentrasi antibodi paling rendah pada mencit perlakuan 175 Gy. Pada paska imunisasi ketiga konsentrasi antibodi pada mencit perlakuan 175 Gy meningkat hingga 3 kali lipat sedangkan konsentrasi antibodi mencit perlakuan yang lain menurun. Seminggu paska ujiantang produksi antibodi mencit 175 Gy menurun, kemudian kembali meningkat dua minggu dan sebulan paska ujiantang. Konsentrasi antibodi paska vaksinasi pertama, kedua dan ketiga diantara perlakuan berbeda nyata pada $p \leq 0,05$

Imunisasi pada mencit bertujuan untuk memicu Respon imun untuk melindungi mencit dari infeksi parasit malaria sehingga dapat menekan pertumbuhan parasit dalam darah. Tingkatkan proteksi dilihat dari tidak terjadi pertumbuhan parasit pada mencit setelah ujiantang dengan parasit darah yang infeksius. Ujiantang dilakukan 1 bulan setelah imunisasi pertama atau 2 minggu setelah imunisasi ke-3. Mencit perlakuan 150 Gy sudah terinfeksi parasit sebelum ujiantang sehingga mencit tidak dapat terproteksi terhadap parasit infeksius. Semua mencit pada kelompok 175 Gy terproteksi hingga 2 minggu paska ujiantang. 60 persen mencit tetap terproteksi hingga hari ke-62 (Tabel 2).

Tabel 2. Persentase mencit yang terproteksi 1,2,3,4 minggu setelah ujiantang dengan *P. berghei* stadium eritrositik

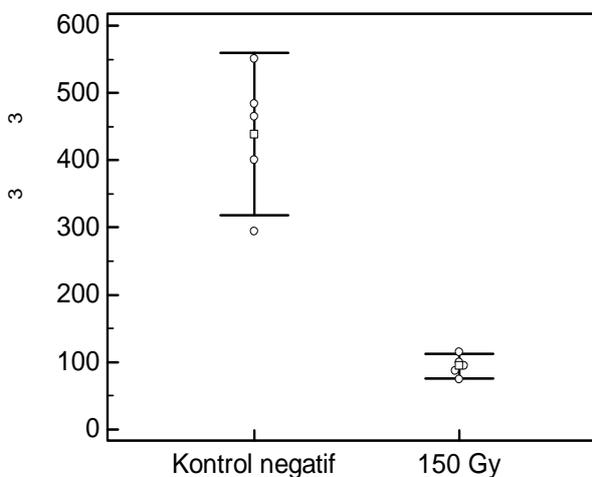
Perlakuan	Paska ujiantang	Proteksi (%)
150 Gy	1 minggu	0
	1 minggu	100
175 Gy	2 minggu	100
	3 minggu	60
	4 minggu	60

Antibodi yang terbentuk akan menghambat pertumbuhan parasit (Gambar 1). Pengujian kemampuan antibodi dalam melawan parasit dilakukan dengan ujiantang 2 minggu setelah booster kedua. Pertumbuhan parasit pada kelompok 150 Gy meningkat tajam hingga mencapai puncaknya 62 %, semua mencit mati pada hari ke-13 paska ujiantang. Pertumbuhan parasit antara kelompok 150 dan 175 Gy berbeda secara bermakna pada $p = 0,03$.



Gambar 1. Pertumbuhan parasit paska ujiantang pada kelompok mencit 150 Gy dan 175 Gy

Peningkatan pertumbuhan parasit dalam sel darah merah pada umumnya diikuti oleh penurunan kadar eritrosit inang. Proses degradasi hemoglobin inang oleh parasit akan menyebabkan terjadinya anemia pada malaria [4]. Anemia adalah manifestasi dari gejala klinis yang dapat terlihat pada pasien dengan malaria. Antibodi yang terbentuk akan menghambat pertumbuhan parasit dan mengurangi manifestasi dari gejala klinis malaria yang muncul, salah satu gejala klinis malaria yang umum terjadi adalah anemia (13). Untuk mengetahui pengaruh imunisasi ulang terhadap patologi malaria dilakukan pengamatan jumlah eritrosit (Gambar 2).



Gambar 2. Jumlah eritrosit mencit kelompok 150 Gy dan 175 Gy dibandingkan dengan jumlah eritrosit pada mencit normal (kontrol negatif)

Mencit kelompok 150 Gy pada hari ke 38 mengalami penurunan eritrosit hingga 20 % dari nilai normal. Penurunan eritrosit pada kelompok 150 Gy terjadi pada paska imunisasi ke tiga, sedangkan jumlah eritrosit kelompok 175 Gy terjadi peningkatan. Setelah uji tantang hingga hari ke-62 jumlah eritrosit pada mencit kelompok 175 Gy hanya mengalami sedikit penurunan dan tidak terjadi perbedaan yang nyata dengan kelompok kontrol negatif. Dari hasil penelitian tersebut di atas membuktikan imunisasi ulangan *P. berghei* yang diradiasi 175 Gy bisa menekan pertumbuhan parasit, mencegah manifestasi gejala klinis dan mencit tetap sehat sampai hari 62.

P. berghei yang diradiasi akan mengalami hambatan dalam pematangannya, sehingga parasit radiasi yang disuntikan ke dalam mencit akan membentuk depot antigen yang dapat memicu respon imun mencit. Seperti yang dinyatakan oleh Smith bahwa teknik nuklir/iradiasi dapat melemahkan agen penyakit tanpa menghilangkan daya imunogeniknya [5]. *P. berghei* lemah atau non-aktif karena radiasi diharapkan dapat memicu respon imun mencit sehingga dapat menekan pertumbuhan parasit. Antibodi merupakan komponen imun humoral yang berperan dalam respon imun. Antibodi merupakan salah satu indikator yang umum digunakan untuk mengetahui derajat kekebalan tubuh terhadap suatu antigen [6].

Pada penelitian ini bertujuan untuk mengetahui efek imunisasi ulang dengan *P. berghei* ANKA yang diradiasi dengan dosis 150 Gy dan 175 Gy terhadap respon antibodi mencit Swiss. Imunisasi kedua dan ketiga dilakukan 7 dan 15 hari paska imunisasi pertama. Dari hasil penelitian yang diperoleh seperti tersebut di atas diketahui *P. berghei* yang diradiasi dengan dosis 175 Gy setelah imunisasi ketiga dapat memicu peningkatan konsentrasi antibodi hingga 9 kali dari konsentrasi antibodi awal. Setelah satu bulan paska imunisasi pertama dilakukan uji tantang untuk mengetahui apakah respon imun yang diperoleh dapat memberikan proteksi terhadap *P. berghei* yang infeksius. Hasil yang diperoleh menunjukkan kelompok mencit yang divaksinasi *P. berghei* radiasi 175 Gy terproteksi 100 % hingga 2 minggu paska uji tantang. Sebanyak 60 % mencit tetap terproteksi hingga hari ke-62.

Tahapan yang digunakan pada penelitian seperti tersebut di atas dilakukan juga oleh Krystelle dkk dari *Radboud University Nijmegen*

Medical Centre Belanda untuk melihat proteksi mencit jangka panjang paska imunisasi dengan sporozoit *P. berghei* radiasi. Pada penelitian Krystelle semua mencit terproteksi hingga 21 hari paska uji tantang [7]. Penelitian vaksin malaria stadium darah dengan menggunakan mencit sebagai hewan model telah dilakukan oleh beberapa peneliti di Indonesia. Wijayanti dkk. dari fakultas kedokteran UGM melakukan penelitian imunisasi mencit dengan *P. berghei* stadium eritrosit yang diinaktifkan secara kimia. Dari hasil penelitiannya diketahui proteksi parsial terhadap parasit stadium darah dibuktikan dengan rendahnya pertumbuhan parasit dalam darah, perpanjangan periode prepaten, dan menurunnya mortalitas mencit yang diimunisasi [8].

Suksesnya suatu vaksinasi bergantung pada antibodi pelindung yang diproduksi oleh sel B yang mensekresi antibodi. Parasit yang masuk ke dalam darah akan mengaktifasi sel limfosit B. Diawali dengan terjadinya ikatan antara protein plasmodium dengan reseptor sel B kemudian berperan sebagai sel penyaji antigen sel B. Sel akan berinteraksi secara fisik dengan sel T CD4+ melalui ikatan dengan reseptor sel T. Kemudian sel T akan berdiferensiasi menjadi Th2 dan mensekresikan interleukin yang akan memacu sekresi IgG, dan Ig E, Ig M oleh sel B [6], [9]

IgG akan berikatan dengan reseptor Fc γ RI dan Fc γ RII pada monosit dan makrofag yang akan meningkatkan kemampuan fagositosis eritrosit yang terinfeksi plasmodium. Adapun peran Ig E dan IgG M dalam perlindungan terhadap infeksi plasmodium belum jelas, namun diduga Ig E antimalaria berperan patologis menimbulkan malaria berat dengan meningkatkan produksi TNF [10].

Efek antibodi anti-merozoit dalam serum adalah menghambat invasi merozoit ke eritrosit. Oleh karena itu merozoit merupakan target imunisasi untuk melindungi inang, baik pada imunisasi aktif atau pasif. Penggunaan parasit tahap darah dalam pembuatan vaksin akan menginduksi kekebalan protektif yang mencegah infeksi malaria fase eritrositik [11]. Respon antibodi diarahkan terhadap protein pada permukaan merozoit yang berfungsi pada saat menginvasi RBC dengan cara memblokir atau membuat merozoit rentan terhadap fagositosis. Antibodi yang spesifik terhadap antigen parasit memainkan peran penting dalam mengendalikan parasitemia melalui penghambatan selular atau *Antibody-dependent cellular inhibition* (ADCI),

dimana pengikatan antibodi ke fagosit melalui reseptor Fc[12].

Sel B merupakan sel plasma yang berumur panjang yang bertanggungjawab untuk pemeliharaan konsentrasi antibodi dalam serum secara berkelanjutan, sedangkan sel memori B bertanggungjawab dalam mengatur respon sekunder setelah terpapar antigen [13]. Selain itu, sel-sel memori B ini bertahan jangka panjang dan mengisi kolam sel plasma berumur panjang untuk mempertahankan titer antibodi dengan tidak adanya antigen atau patogen. Meskipun antibodi pelindung dianggap pusat kekebalan terhadap malaria, tetapi beberapa studi menunjukkan bahwa kekebalan humoral untuk malaria tahap darah berumur pendek dengan demikian diperlukan imunisasi ulang (*booster*). *Booster* disebut juga dosis penguat merupakan vaksinasi tambahan setelah dosis sebelumnya. Setelah imunisasi awal diperlukan suntikan penguat atau dosis penguat yang berupa paparan antigen secara berulang. Hal ini dimaksudkan untuk meningkatkan kekebalan terhadap antigen itu kembali ke tingkat perlindungan setelah terbukti menurun atau setelah jangka waktu tertentu [14], [15].

Vaksin eritrositik atau vaksin bentuk aseksual darah merupakan jenis vaksin yang paling mudah dikembangkan. Bentuk aseksual parasit bertanggung jawab terhadap timbulnya gejala klinis [16]. Tujuan pemberian vaksin stadium darah adalah untuk menekan keganasan parasit bukan menginduksi imunitas steril. Tahap darah aseksual parasit bertanggung jawab untuk gejala penyakit. Gejala klinis yang umum ditunjukkan oleh penderita malaria adalah anemia. Dari hasil yang diperoleh menunjukkan mencit yang divaksinasi dengan *P. berghei* 175 Gy walaupun hanya 60% mencit yang terproteksi tetapi semua mencit hidup hingga hari ke-62 dan jumlah eritrositnya tidak berbeda nyata dengan mencit kontrol. Oleh karena itu upaya yang signifikan untuk mengembangkan vaksin terhadap tahap siklus hidup tetap diperlukan agar dapat membatasi pertumbuhan parasit dan manifestasinya mencegah atau meminimalkan gejala klinis yang timbul [20]. Vaksin malaria stadium darah akan bermanfaat sebagai vaksin mereduksi penyakit pada daerah endemik dengan menekan multiplikasi merozoit. Perlu ditingkatkan penelitian vaksin ini dengan menggunakan spesies parasit manusia.

KESIMPULAN

Dapat disimpulkan bahwa dosis 175 Gy adalah dosis optimum melemahkan parasit dan imunisasi ulangan dapat meningkatkan antibodi 9 kali, sehingga dapat menekan pertumbuhan parasit, mencegah manifestasi gejala klinis dan mencit tetap sehat sampai hari ke-62.

UCAPAN TERIMA KASIH

Terima kasih diucapkan kepada Pimpinan PTKMR BATAN yang telah memberikan dana DIPA tahunan sehingga penelitian ini dapat selesai. Terima kasih pula kami ucapkan kepada Balai iradiator PAIR BATAN yang telah menyediakan fasilitas radiasi untuk penelitian ini.

DAFTAR PUSTAKA

- [1] J. C. Garber and Wayne barbee, *Guide for the Care and Use of Laboratory Animals, 8th edition. National Academies Press, 8th ed. Washington DC: The Nation Academic Press, 2012.*
- [2] A. Cowman and B. Crabb, *Methods in Malaria Research, 6th ed. Manassass, Virginia: MR4/ATCC, 2013.*
- [3] J. Wipasa *et al.*, "Long-Lived Antibody and B Cell Memory Responses to the Human Malaria Parasites, *Plasmodium falciparum* and *Plasmodium vivax*," 2010.
- [4] J. Quintero *et al.*, "Malaria-related anaemia : a Latin American perspective," vol. 106, pp. 91–104, 2011.
- [5] N. Butler, A. M. Vaughan, J. T. Harty, and S. H. I. Kappe, "Whole parasite vaccination approaches for prevention of malaria infection," *Trends Immunol.*, vol. 33, no. 5, pp. 247–254, May 2012.
- [6] E. Riley and V. A. Stewart, "Immune mechanisms in malaria: new insights in vaccine development.," *Nat. Med.*, vol. 19, no. 2, pp. 168–78, 2013.

- [7] K. Nganou-Makamdop, G.-J. Van Gemert, T. Arens, C. C. Hermesen, R. W. Sauerwein, and S. Kappe, "Long Term Protection after Immunization with *P. berghei* Sporozoites Correlates with Sustained IFN γ Responses of Hepatic CD8 $^{+}$ Memory T Cells," 2012.
- [8] M. Agus Wijayanti, "Pengaruh Imunisasi Mencit dengan Parasit Stadium Eritrositik Terhadap Infeksi *Plasmodium berghei*," *Berkala Ilmu Kedokteran*, vol. 29, 1997.
- [9] M. Mary, Stevenson, Rebecca Ing, Floriana Berretta, and Jenny Miu, "Regulating the Adaptive Immune Response to Blood - Stage Malaria: Role of Dendritic Cells and CD4 + Foxp3 + Regulatory T Cells," *Int. J. Biol. Sci*, vol. 7, 2011.
- [10] F. Zhu, T. Liu, C. Zhao, X. Lu, J. Zhang, and W. Xu, "Whole-Killed Blood-Stage Vaccine-Induced Immunity Suppresses the Development of Malaria Parasites in Mosquitoes," *J. Immunol.*, 2016.
- [11] A. L. Goodman *et al.*, "The Utility of *Plasmodium berghei* as a Rodent Model for Anti-Merozoite Malaria Vaccine Assessment," *Sci Rep*, vol. 3, no. 1706, pp. 1–13, 2013.
- [12] P. Fernandes, R. Frank, M. D. Lewis, and A. K. Mueller, "Plasmodium Attenuation: Connecting the Dots between Early Immune Responses and Malaria Disease Severity," *Front. Microbiol.*, vol. 5, no. DEC, pp. 1–6, 2014.
- [13] K. Good-Jacobson and D. M. Tarlinton, "Multiple Routes to B-cell Memory," *Int. Immunol.*, vol. 1, no. 6, 2012.
- [14] U. Bagai and A. Pawar, "A blood stage fraction of *Plasmodium berghei* Induces Protective and Long Lasting Immune Response in BALB/c mice," *Parasitol. Int.*, vol. 62, no. 3, pp. 329–336, 2013.
- [15] R. Schats *et al.*, "Heterologous Protection Against Malaria after Immunization with *Plasmodium falciparum* Sporozoites," *PLoS One*, 2015.

