

See discussions, stats, and author profiles for this publication at: <https://www.researchgate.net/publication/304019590>

UJI EFEKTIVITAS IRADIASI GAMMA DALAM MELEMAHKAN Plasmodium berghei MELALUI INKORPORASI...

Article · February 2014

CITATIONS

0

READS

17

2 authors:



Teja Kisananto

Badan Tenaga Nuklir Nasional

12 PUBLICATIONS 1 CITATION

SEE PROFILE



Mukh Syaifudin

PTKMR BATAN

30 PUBLICATIONS 231 CITATIONS

SEE PROFILE

Some of the authors of this publication are also working on these related projects:



Detection Biomarker Gamma H2AX, 53BPI in Medical Radiation Worker [View project](#)



Micronucleus Frequencies and DNA Repair Genes Polymorphisms in High Background Radiation Area Inhabitants [View project](#)

UJI EFEKTIVITAS IRADIASI GAMMA DALAM MELEMAHKAN *Plasmodium berghei* MELALUI INKORPORASI H-3 HIPOKSANTIN

Teja Kisananto dan Mukh Syaifudin

Pusat Teknologi Keselamatan dan Metrologi Radiasi-BATAN, Jakarta
E-mail : kisananto@batan.go.id

ABSTRAK

UJI EFEKTIVITAS IRADIASI GAMMA DALAM MELEMAHKAN *Plasmodium berghei* MELALUI INKORPORASI H-3 HIPOKSANTIN. Vaksin malaria yang bersifat protektif saat ini belum dapat diperoleh, terlebih lagi vaksin yang khas untuk populasi Indonesia. Salah satu cara terbaik untuk memperoleh vaksin adalah dengan meng-atenuasi plasmodium menggunakan sinar gamma. Studi menunjukkan bahwa inang yang disuntik *Plasmodium sp.* iradiasi mampu menekan efek malaria pasca uji tantang. Studi viabilitas seluler parasit pasca iradiasi juga berperan penting dalam pengembangan vaksin. Penelitian ini bertujuan untuk memperoleh pemahaman tentang viabilitas atau daya invasif *P. berghei* yang diatenuasi sinar gamma terhadap sel eritrosit. Sebanyak 6 ekor mencit disuntik secara intraperitoneal *P. berghei* yang telah diiradiasi dosis 150 dan 200 Gy bersama-sama dengan H3-hipoksantin masing-masing 3 ekor. Tiga ekor mencit lain disuntik *P.berghei* yang tidak diiradiasi (0 Gy) sebagai kontrol. Pada waktu-waktu tertentu pasca penyuntikan, viabilitas *P.berghei* diuji dengan mencacah inkorporasi hipoksantin berlabel tritium (H-3) dalam darah dengan *Liquid Scintillation Counter* (LSC). Hasil penelitian menunjukkan bahwa daya invasif *P.berghei* dalam sel eritrosit darah mencit dapat diatenuasi dengan sinar gamma dan berbanding lurus dengan nilai aktivitas tritium (inkorporasi hipoksantin pada parasit). Dosis iradiasi yang efektif untuk melemahkan parasit adalah 200 Gy. Hal ini ditandai dengan derajat parasitemia dan nilai aktivitas tritium yang lebih rendah apabila dibandingkan dengan dosis iradiasi 150 Gy.

Kata kunci : *Plasmodium berghei*, sinar gamma, viabilitas, inkorporasi hipoksantin berlabel tritium

ABSTRACT

EFFECTIVENESS TEST OF GAMMA IRRADIATION IN WEAKENING *Plasmodium berghei* THROUGH INCORPORATION OF H-3 HYPOXANTHINE. Protective malaria vaccine that has yet to be obtained, especially vaccines that are typical for the population of Indonesia. One of the best method to obtain the vaccine is by irradiating the plasmodium using gamma ray. Studies showed that the host injected with irradiated *Plasmodium sp.* can reduce the effects of malaria after challenge test. Study on the cellular parasite viability after irradiation was also needed in the development of vaccines. Purpose of this experiment was to gain an understanding of the viability or invasive *P. berghei* that attenuated with gamma rays on erythrocyte cell. Six mice were intraperitoneally injected with 150 and 200 Gy irradiated *P. berghei* in combination with H3-hypoxanthine for 3 mice each. Another group of mice were injected with non irradiated (0 Gy) *P.berghei* served as control. At various times post injection, *P.berghei* viability was tested by counting the incorporation of tritium labeled hypoxanthine in blood with the *Liquid Scintillation Counter* (LSC). The results showed that the invasive *P.berghei* in the blood cells erythrocytes of mice can attenuated with gamma rays and directly proportional to the value of tritium activity (hypoxanthine incorporation into parasites). The effective dose of irradiation to attenuate the parasite was 200 Gy. It is characterized by the degree of parasitemia and tritium activity values that was lower compared with irradiation dose of 150 Gy.

Keywords: *Plasmodium berghei*, gamma rays, viability, incorporation of tritium labeled hypoxanthine

I. PENDAHULUAN

Malaria menyebabkan sekitar 300 juta kasus klinis dengan 1-3 juta kematian setiap tahun, terutama wanita dan anak-anak [1,2,3]. Malaria tersebar di 109 negara dengan tingkat risiko hingga 40% [2]. Di Indonesia, malaria merupakan penyakit yang harus ditangani dan dikendalikan dengan berbagai tindakan, antara lain dengan vaksinasi. Jumlah penderita penyakit malaria yang meninggal tahun 2005 mencapai 0,92 persen, tahun 2006 turun menjadi 0,42 persen dan tahun 2007 turun lagi menjadi 0,2 persen. Oleh karena itu sejak tahun 2010 lalu telah dicanangkan gerakan eliminasi malaria. Malaria disebabkan oleh plasmodium melalui gigitan *Anopheles* betina terinfeksi. Sekali berada di dalam sel, protein-protein tertentu muncul dipermukaannya [4]. Malaria sulit diberantas dan salah satu alternatif untuk mengatasi masalah malaria tersebut adalah tindakan pencegahan dengan pemberian vaksin [5]. Penelitian dan pengembangan vaksin terus mengalami kemajuan antara lain melalui *Malaria Vaccine Technology Roadmap* yang bertujuan untuk mempercepat pengembangan vaksin sehingga diharapkan pada tahun 2025 telah diperoleh vaksin dengan efektivitas lebih dari 80% dengan daya proteksi lebih dari 4 tahun serta aman [6,7].

Plasmodium berghei adalah hemoprotozoa yang menyebabkan penyakit malaria pada rodensia, terutama rodensia kecil. *Plasmodium berghei* banyak digunakan dalam penelitian pengembangan biologi parasit malaria pada manusia karena tersedia teknologi pembiakan secara *in vitro* dan pemurnian pada tahapan siklus hidup, pengetahuan pada susunan genom dan pengaturannya. Bahkan secara molekuler, *Plasmodium berghei* sama seperti plasmodium menginfeksi manusia.

Viabilitas parasit merupakan hal sangat penting dalam pengembangan vaksin *life-attenuated* dengan sinar gamma [8]. 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 [9]. Perkembangan sistem kultur *in vitro Plasmodium falciparum* pun telah berkembang cepat terutama untuk uji obat anti malaria. Sedangkan untuk vaksin masih belum banyak dilakukan. 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 [10].

Hipoksantin adalah derivat purin yang terjadi secara alamiah, biasanya ditemukan sebagai penyusun asam nukleat, memiliki tautomer 6-hidroxy-purine. Hipoksantin merupakan bahan aditif dalam sel tertentu, bakteri dan kultur parasit sebagai substrat dan sumber nitrogen. Peneliti juga menyatakan bahwa *P. berghei* dapat menginkorporasi purin (3H-adenosine dan 3H-hypoxanthine) dan bukan pirimidin. Jumlah inkorporasi ini sebanding dengan jumlah parasit [11]. Karena pengamatan parasit dengan mikroskop memiliki kelemahan, maka perlu dikembangkan teknik inkorporasi senyawa berlabel isotop, baik untuk uji obat maupun untuk pengembangan vaksin. Tujuan penelitian adalah pengembangan teknik uji viabilitas *Plasmodium sp.* pasca iradiasi gamma dengan pelabelan H-3-hipoksantin.

II. BAHAN DAN METODE

Propagasi awal *P. berghei* dalam tubuh mencit

Plasmodium berghei strain ANKA (P4) diinokulasi secara intraperitoneal pada 3 mencit Swiss Webster dan 3 hari kemudian mulai diamati parasitemianya setiap hari. Setelah parasitemia mencapai $\pm 20\%$, mencit dianestesi dengan ketamil 0,5 ml dan darah diambil dari jantung menggunakan *syringe* 1 ml yang berisi anti koagulan (*citrat phospat dextrose/CPD*) sebanyak 0,2 ml. Sebanyak 200 μ l darah terinfeksi ($\pm 1 \times 10^6$ parasit/ml inokulum

stadium eritrositik) disuntikkan pada 3 ekor mencit berikutnya secara intraperitoneal. Parasitemia pada mencit diamati setiap hari dengan mengambil darah perifer sekitar 5 µl dari ujung ekor. Parasitemia pada masing-masing mencit yang diumpangkan, dicek secara mikroskopis hingga diperoleh 5-10% parasitemia.

Pewarnaan Giemsa pada apusan darah tipis dan pengamatan parasitemia.

Darah dari ujung ekor tikus sekitar 5 µl dibuat sediaan apusan darah tipis pada kaca preparat. Setelah apusan mengering kemudian difiksasi dengan metanol absolut selama 30 detik. Apusan diwarnai dengan 10 % larutan Giemsa selama 15 menit. Selanjutnya preparat diamati dengan menggunakan mikroskop cahaya pada perbesaran 100x. Parasitemia dihitung dengan memilih bagian-bagian dimana tiap lapangan pandang mengandung sel dengan susunan tidak saling menumpuk. Dihitung jumlah eritrosit yang terinfeksi parasit sekitar 1000 sel eritrosit yang terhitung. Parasitemia menunjukkan kepadatan sel darah terinfeksi parasit dalam ±5000 sel darah merah atau 10 lapang pandang dengan rumus sebagai berikut :

$$\frac{\sum \text{sel darah merah yang terinfeksi parasit} \times 100\%}{\sum \text{total sel darah merah}}$$

Uji viabilitas parasit.

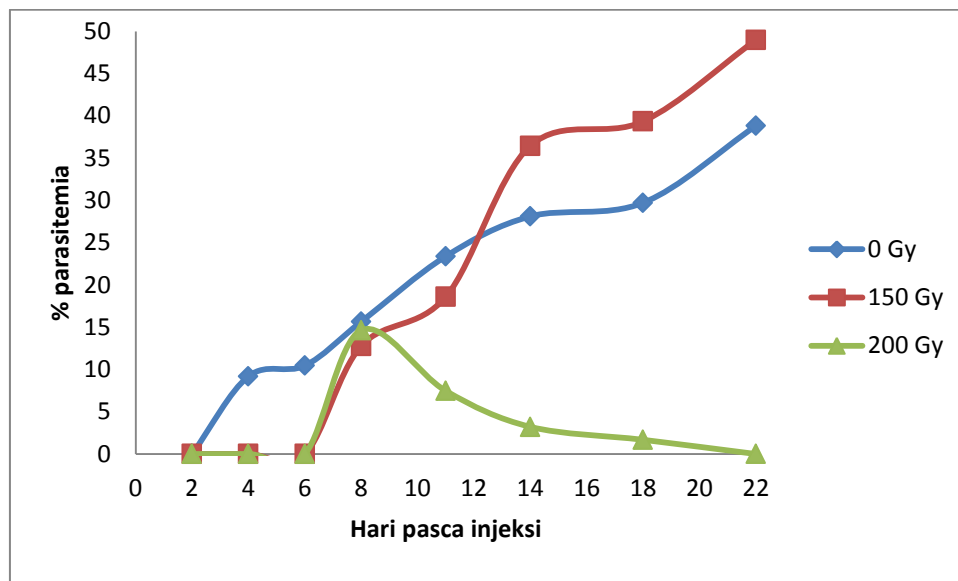
Darah terinfeksi parasit ($\pm 10^6$ parasit/ml) diiradiasi dengan variasi dosis 0, 150, dan 200 Gy (laju dosis 380 Gy/jam) kemudian dicampurkan dengan 100 µl hipoksantin berlabel tritium (Amersham) dengan aktivitas 1-2 µCi (37 dan 74 KBq) per mencit (diencerkan dengan larutan saline steril). Kemudian disuntikkan pada 3 ekor mencit untuk masing-masing dosis secara intraperitoneal. Dalam rentang waktu 2 menit hingga 24 jam kemudian, darah diambil dari ekor mencit ± 5 µl dan dibuat

apusan darah tipis pada kaca preparat. Setelah kaca preparat mengering, selanjutnya difiksasi dengan metanol absolut selama 30 detik. Kemudian dilakukan pewarnaan dengan larutan Giemsa 10% selama 15 menit dan diamati dengan mikroskop cahaya perbesaran 100x. Tahapan kegiatan ini dilakukan hingga hari ke-22 pasca injeksi.

Darah mencit ± 10 µl ditambahkan 5 ml aqua bidestilata steril (Ikaparmindo Putramas) dan 12 ml larutan *cocktail* OPTIMA GOLD™ LLT (Perkin Elmer) ke dalam vial. Masing-masing parasit berlabel dicacah menggunakan alat *Liquid Scintillation Counter* (LSC) selama 1 jam.

III. HASIL DAN PEMBAHASAN

Pertumbuhan parasit ditandai dengan meningkatnya jumlah atau densitas parasit dalam sirkulasi darah tepi. Densitas pertumbuhan parasit di dalam darah dinyatakan dengan persen parasitemia. Persen parasitemia menunjukkan jumlah eritrosit yang terinfeksi parasit. Waktu minimum mulai dari masuknya parasit dalam tubuh sampai dengan pertama terlihatnya merozoit di dalam eritrosit adalah periode prepaten. Periode prepaten dan persen parasitemia dipengaruhi oleh virulensi parasit. Virulensi parasit salah satunya ditentukan oleh daya multiplikasi parasit dan daya invasi parasit [12]. Pada penelitian ini, mencit kontrol tanpa iradiasi (0 Gy) mulai terjadi pertumbuhan parasit sejak hari ke-4 pasca injeksi, sedangkan mencit yang mengalami perlakuan iradiasi dengan dosis 150 Gy dan 200 Gy terjadi pada hari ke-8 pasca injeksi (Gambar 1). Seperti disebutkan oleh Tork dalam Landau bahwa penundaan periode prepaten hingga 2 hari sudah signifikan [12]. Hal ini menunjukkan iradiasi dapat melemahkan parasit sehingga daya invasif parasit menurun.



Gambar 1. Persentase parasitemia dengan variasi dosis 0, 150, dan 200 Gy setelah ditambahkan hipoksantin yang berlabel tritium.

Pada dosis 0 Gy dan 150 Gy, pertumbuhan parasit terus mengalami peningkatan yang cukup cepat. Hal ini disebabkan oleh sistem imunitas yang belum bekerja. Pada dosis 0 Gy, pertumbuhan parasit dalam darah tidak mengalami hambatan karena tidak dilemahkan dengan iradiasi. Sedangkan pada dosis 150 Gy, daya invasif parasit dapat tertahan hingga hari ke-6 pasca injeksi. Berdasarkan penelitian sebelumnya, dosis 150 Gy kurang efektif dalam melemahkan parasit.

Pada dosis 200 Gy, pertumbuhan parasit mulai terjadi pada hari ke-8, tetapi kemudian mulai turun kembali di hari ke-11, hingga akhirnya parasit tersebut sudah tidak muncul lagi pada hari ke-22 dan mencitnya pun dapat bertahan hidup. Hal ini kemungkinan disebabkan oleh mekanisme imunitas tubuh yang bekerja menekan pertumbuhan parasit. Dari data ini menunjukkan bahwa dosis 200 Gy lebih efektif untuk melemahkan parasit jika dibandingkan dengan dosis 150 Gy (Tabel 1). Menurut Wellde, tingkat resistensi terhadap malaria yang diperoleh mencit sebanding dengan besar dosis iradiasi dan jumlah dosis imunisasi. Vaksin stadium darah efektif dalam mereduksi morbiditas

dan mortalitas mencit walaupun vaksin ini tidak dapat mengeliminasi semua parasit [13].

Tabel 1. Hasil pengamatan parasitemia dengan variasi dosis 0, 150, dan 200 Gy setelah ditambahkan hipoksantin yang berlabel tritium.

Hari ke	Persentase parasit (%)		
	0 Gy	150 Gy	200 Gy
2	0.00	0.00	0.00
4	9.19	0.00	0.00
6	10.45	0.00	0.00
8	15.65	12.79	14.65
11	23.39	18.60	7.46
14	28.11	36.46	3.21
18	29.72	39.35	1.68
22	38.82	48.98	0.00

Pelabelan parasit malaria dengan radioaktif untuk sintesis DNA dimulai pada tahun 1967-1968 ketika Bungenerand Nielsen menunjukkan penggabungan (inkorporasi) *purin nucleotide* ke dalam DNA dan RNA dari *Plasmodium berghei* dengan film autoradiografi dari pelabelan parasit *in vitro*. Penelitian lebih lanjut menunjukkan bahwa pelabelan parasit

malaria dengan hipoksantin digunakan untuk sintesis nukleotida purin. Sejak saat itu inkorporasi hipoksantin digunakan untuk pelabelan parasit malaria dengan berbagai tujuan [9]. Faktor-faktor yang mempengaruhi inkorporasi H-3 hipoksantin adalah jenis parasit, stadium parasit dan konsentrasi eritrosit yang tidak terinfeksi.

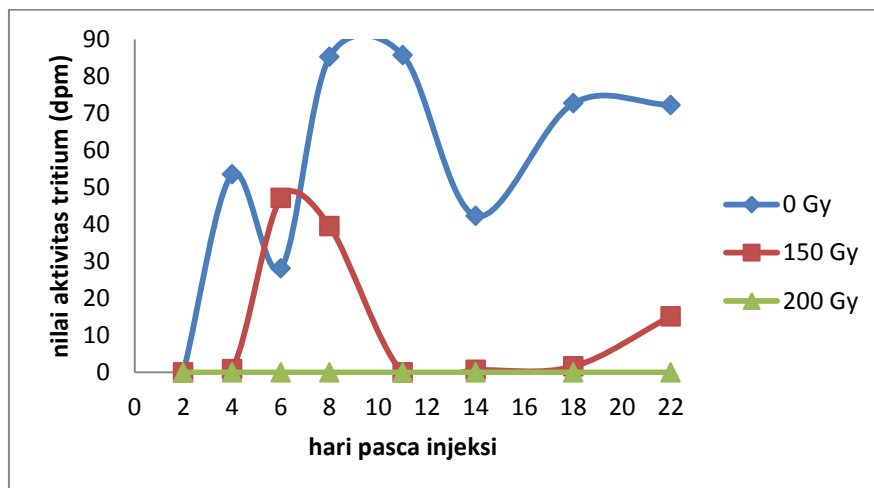
Pada penelitian ini, dosis 0 Gy mulai adanya aktivitas tritium pada hari ke-4 dan mengalami fluktuasi pada hari ke-6 sampai hari ke-22 (Gambar 2). Hal ini disebabkan proses inkorporasi hipoksantin dalam darah terjadi sangat cepat dan menunjukkan adanya pertumbuhan parasit. Ting dan Sherman (1981) menemukan dalam teknik *in vitro* bahwa proses pengambilan hipoksantin sangat cepat dan *Plasmodium falciparum* dalam eritrosit manusia yang terinfeksi dengan inkorporasi hipoksantin dicapai dalam waktu 30 detik. Hal ini menunjukkan bahwa proses masuknya hipoksantin terjadi secara difusi sederhana [14].

Pada dosis 150 Gy, nilai aktivitas tritium yang diperoleh tidak sebesar dosis 0 Gy (Tabel 2). Hal ini dikarenakan iradiasi

gamma dapat melemahkan parasit sehingga inkorporasi hipoksantin dalam darah menjadi terhambat. Sedangkan pada dosis 200 Gy, nilai aktivitas tritium tidak terdeteksi. Hal ini terjadi karena dosis 200 Gy dapat menghambat sekaligus melemahkan daya invasif parasit dengan baik sehingga parasit tidak muncul lagi pada sel eritrosit darah mencit.

Tabel 2. Hasil pencacahan aktivitas tritium dengan LSC.

Hari Ke-	Nilai Aktivitas Tritium (dpm)		
	0 Gy	150 Gy	200 Gy
2	0.000	0.000	0.000
4	53.470	0.823	0.000
6	28.127	47.106	0.000
8	85.239	39.458	0.000
11	85.678	0.000	0.000
14	42.291	0.631	0.000
18	72.664	1.587	0.000
22	72.223	15.141	0.000



Gambar 2. Nilai aktivitas tritium dengan variasi dosis 0, 150, dan 200 Gy setelah pencacahan dengan LSC.

IV. KESIMPULAN

Daya invasif parasit dalam sel eritrosit darah menciit dapat diatenuasi dengan sinar gamma dan berbanding lurus dengan nilai aktivitas tritium. Dosis iradiasi yang efektif untuk melemahkan parasit adalah pada dosis 200 Gy. Hal ini ditandai dengan derajat parasitemia dan nilai aktivitas tritium yang lebih rendah apabila dibandingkan dengan dosis iradiasi 150 Gy.

DAFTAR PUSTAKA

1. WORLD HEALTH ORGANIZATION, Initiative for Vaccine Research, State the art of vaccine research and development, <http://www.who.int/vaccines-documents>, 2005.
2. LUKE, T.C. and HOFFMAN, S.L., Rationale and plans for developing a non-replicating, metabolically active, radiation-attenuated *Plasmodium falciparum* sporozoite vaccine, *The Journal of Experimental Biology*, 206, 3803-3808, 2003.
3. SYAFRUDDIN, D., ASIH, P.B., CASEY, G.J., MAGUIRE., J., BAIRD, J.K., NAGESHA, H.S., COWMAN, A.F., REEDER, J.C., Molecular Epidemiology of *Plasmodium falciparum* Resistance to Antimalarial Drugs in Indonesia, *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, 72(2), 174-181, 2005.
4. SAFITRI, I., *Vaksin Malaria Semakin Dekat?, Guru Besar dari Bagian Ilmu Biokimia Fakultas Kedokteran Universitas Airlangga*, 2003.
5. 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. *Malarial Journal*, 15;6 (1), 151-155, 2007.
6. NUSSENZWEIG, R. et al., Protective immunity produced by the injection of x-irradiated sporozoites of *Plasmodium berghei*. *Nature*, 216, 160, 1967.
7. PATARROYO, ME. The current status and future plans for the Malaria Vaccine Technology Roadmap, Fourth MIM Pan-African Malaria Conference, Yaounde, Cameroon, 2005.
8. MADRID, D.C., TING, L.M., WALLER, K.L., SCHRAMM V.L., AND KIM, K., *Plasmodium falciparum* Purine Nucleoside Phosphorylase Is Critical for Viability of Malaria Parasites, *Journal of Biological Chemistry*, 283, 35899-35907, 2008.
9. 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.
10. ELABBADI, N., ANCELIN, M.L., and VIAL, H.J., Use of radioactive ethanolamine incorporation into phospholipids to assess *in vitro* antimalarial activity by the semiautomated microdilution technique. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 36: 50–55, 1992.
11. BUNGENER, W. and NELSEN, G., Nucleic acid metabolism in experimental malaria. 1. Studies on the incorporation of thymidine, uridine and adenosine in the malaria parasites (*P. berghei* and *P. vinckei*), *Parasitology*, 18, 546-462, 1967.
12. LANDAU, J., BOULARD, Y., Lifecycles and morphology, In: *Rodent Malaria*, R. KILLICK-KENDRICK (Ed.), Academic Press, London, 1978, 53–157.
13. WELLDE, B.T. AND SADUN, E..H., Resistance produced in rats and mice by exposure to irradiated *Plasmodium berghei*, *Experimental parasitology* 21,310-324, 1967.
14. TING A.W., SHERMAN I.W., Hypoxanthine transport in normal and malaria-infected erythrocytes, *Int. J. Biochem.* 13: 955-958, 1981.

TANYA JAWAB

Penanya : Indra Mustika

Pertanyaan :

- Mengenai pemilihan dosis radiasi 150 Gy dan 200 Gy, apakah pada dua dosis tersebut random atau ada peraturan tentang pemilihan dosis di Kemenkes?
- Apakah mungkin dosis terbaik diatas 200 Gy?

Jawaban :

- Tidak ada random dalam rentang 150-200 Gy dan tidak ada peraturan dari Kemenkes tetapi didasarkan pada hasil-hasil penelitian di luar negeri dan penelitian kami sebelumnya yang menunjukkan dosis antara 175 dan 200 Gy cukup efektif untuk melemahkan parasit.
- Dosis di atas 200 Gy, parasit justru memiliki daya invasive yang tinggi (infektif) atau mengalami kematian karena kerusakan yang parah.