

Kemampuan fagositosis makrofag peritoneum mencit yang diimunisasi selama infeksi *Plasmodium berghei*

Mahardika Agus wijayanti

Bagian Parasitologi, Fakultas Kedokteran, Universitas Gadjah Mada,
Yogyakarta

ABSTRACT

Mahardika Agus Wijayanti – *Phagocytic activity of immunized-mouse peritoneal macrophages during Plasmodium berghei infection*

Background: Macrophage represents one of the cellular component of the immune system which plays an important role during malarial infection. Both the number and functional activities including phagocyte activity of these cells increase during the infection.

Objectives: This study was carried out to investigate the phagocyte activity of peritoneal macrophages from immunized and non-immunized mice during *P. berghei* infection.

Methods: Swiss mice were divided into two groups, one experimental group was immunized by crude vaccine *P. berghei*, one control group was not immunized. Phagocyte activity was measured by the ability of mouse peritoneal macrophages to phagocytes latex particles *in vitro*.

Results: In non-immunized mice the percentage of macrophages which were phagocyte latex particles was increased during early infection, reached a peak of about 9 times of the normal level then declined until the mice died. In the immunized mice this activity was increased to reach a peak of about 11 times of the normal level and remained high until recovery.

Conclusion: Phagocyte activity of immunized-mice peritoneal macrophages was significantly higher than those of non immunized. The increase of the phagocyte activity seemed to be correlated with the ability of mice to overcome the infection.

Key words : Immunization – *P. berghei* - Effector cells – Macrophages - Phagocytosis

ABSTRAK

Mahardika Agus Wijayanti – *Kemampuan fagositosis makrofag peritoneum mencit yang diimunisasi selama infeksi Plasmodium berghei*

Latar belakang penelitian: Makrofag adalah salah satu sel kekebalan yang mempunyai peran penting dalam pertahanan terhadap infeksi malaria. Selain jumlahnya, beberapa aktivitas sel tersebut umumnya meningkat selama infeksi termasuk aktivitas fagositosis.

Tujuan penelitian: Penelitian ini dilakukan untuk mengetahui perbedaan kemampuan fagositosis makrofag peritoneum pada mencit yang diimunisasi dan yang tidak diimunisasi selama infeksi *P. berghei*.

Bahan dan cara penelitian: Mencit dibagi menjadi dua kelompok, satu kelompok perlakuan diimunisasi dengan *crude* vaksin *P. berghei* sedangkan kelompok kontrol tidak diimunisasi. Kemampuan fagositosis diukur dari kemampuan sel makrofag peritoneum untuk memfagositosis partikel latex *in vitro*.

Hasil penelitian: Pada kelompok mencit yang tidak diimunisasi kemampuan sel makrofag untuk memfagositosis partikel latex meningkat sejak awal infeksi dan pada hari ke-6 mencapai puncak kira-kira 9x dari angka normal, kemudian menurun sampai akhirnya angka mati pada hari ke-10. Pada mencit yang diimunisasi kemampuan sel untuk memfagositosis partikel latex meningkat sampai 11x pada hari ke-6 kemudian sedikit menurun, tetapi tetap tinggi sampai mencit sembuh.

Simpulan: Kemampuan fagositosis makrofag peritoneum mencit Swiss yang diimunisasi selama infeksi *P. berghei* lebih tinggi secara bermakna daripada makrofag peritoneum mencit yang tidak diimunisasi. Kemampuan fagositosis ini nampaknya berkaitan dengan kemampuan mencit untuk mengatasi infeksi.

(B.I.Ked. Vol. 31, No. 4:213-218, Desember 1999)

PENGANTAR

Respon imun pada penderita malaria menunjukkan gambaran yang berbeda jika dibandingkan dengan penderita penyakit infeksi yang lain. Perkembangan imunitas protektif pada penderita malaria sangat sulit didapat meskipun telah beberapa kali mengalami infeksi akut. Di daerah endemik seringkali terjadi kematian pada bayi akibat infeksi yang pertama kali oleh *Plasmodium falciparum*, akan tetapi jika anak tersebut sembuh maka pada usia 3-4 tahun akan berkembang respon imunitasnya yang ditunjukkan dengan kemampuannya untuk menghambat peningkatan parasitemia meskipun tanpa pemberian obat anti malaria. Dasar imunologis dari keadaan tersebut masih belum jelas, salah satu kemungkinannya adalah adanya subpopulasi antigenik atau variasi antigenik yang cukup besar pada galur *P. falciparum*, yang ada di daerah endemis. Kemungkinan yang lain adalah infeksi malaria dapat menginduksi keadaan immunosupresif sehingga akan mempengaruhi induksi dan ekspresi respon imun protektif¹.

Respon imunitas humoral dan selular keduanya berperan dalam imunitas protektif terhadap penyakit malaria. Meskipun antibodi ini bersifat protektif tetapi kemampuan imunogen untuk menginduksi respon imun yang protektif sangat tergantung pada pengenalan sel T². Berbagai limfokin yang dihasilkan oleh sel T dapat meningkatkan aktivasi sel-sel efektor seperti misalnya makrofag. Makrofag sebagai sel pertahanan dapat melakukan aktivitasnya dengan berbagai cara seperti fagositosis dan destruksi mikroorganisme³. Selama infeksi malaria, produksi sel makrofag ini meningkat dan terjadi akumulasi pada berbagai organ tubuh dalam keadaan teraktivasi yang ditunjukkan dengan adanya perubahan fenotipe permukaan serta kemampuan sekresi dan fagositosis⁴. Aktivitas fagositosis makrofag berperan pada eliminasi eritrosit terinfeksi oleh hati dan limpa selama infeksi malaria⁵.

Konsep yang mengatakan bahwa makrofag berperan dalam imunitas selular terhadap malaria stadium eritrositik berdasar pada penelitian terhadap berbagai binatang percobaan. Penelitian terhadap mencit yang diinfeksi dengan *P. berghei* oleh Zuckerman dkk⁶ menunjukkan bahwa *uptake* eritrosit pada setiap makrofag limpa sangat meningkat dibanding makrofag limpa normal. Peningkatan tersebut dapat mencapai 200x, terutama di sekitar puncak parasitemia. Keadaan ini akan memperberat anemia sebagai akibat rusaknya eritrosit yang terinfeksi parasit malaria. Berdasarkan keadaan tersebut di atas maka permasalahan pada penelitian ini adalah : Apakah pemberian imunisasi dapat mempengaruhi kemampuan fagositosis makrofag. Untuk mengetahui gambaran aktivasi fungsi makrofag selama infeksi plasmodium pada manusia masih diperlukan data dasar dari uji laboratorium yang dilakukan terhadap binatang percobaan sehingga diharapkan dapat menunjang keberhasilan saat diterapkan penggunaannya pada plasmodium yang menginfeksi manusia. Pada penelitian ini fungsi makrofag dipelajari dari makrofag peritoneum mencit Swiss yang telah diinfeksi dengan *P. berghei*. Tujuan utama dari penelitian ini adalah mengetahui perbedaan kemampuan fagositosis makrofag peritoneum pada mencit yang diimunisasi dan tidak diimunisasi selama infeksi *P. berghei*.

BAHAN DAN CARA

Imunisasi dan infeksi hewan coba. Terhadap satu kelompok mencit Swiss sebagai kelompok perlakuan dilakukan imunisasi sebelum diinfeksi sedangkan satu kelompok lainnya sebagai kelompok kontrol tidak diimunisasi. Imunisasi mencit Swiss dilakukan dengan cara suntikan intraperitoneal 0,2 ml *crude* vaksin *P. berghei* yang mengandung 2×10^8 parasit ekstraselular ditambah dengan 0,2 ml *Freund's Complete Adjuvant* (FCA) dan di booster 2x dengan vaksin

yang sama ditambah *Freund's Incomplete Adjuvant* (FICA). Booster dilakukan dengan selang waktu 2 minggu. Infeksi hewan coba dilakukan dengan cara mengencerkan sejumlah darah donor dengan parasitemia 30 – 40% dalam medium RPMI. Infeksi dilakukan dengan cara suntikan intraperitoneal 0,2 ml inokulum yang mengandung 1×10^8 parasit stadium eritrositik. Infeksi ini dilakukan baik pada mencit Swiss yang diimunisasi maupun tidak. Pada mencit yang diimunisasi, infeksi dilakukan 2 minggu setelah imunisasi yang terakhir.

Isolasi dan kultur makrofag peritoneum.

Dari ke-2 kelompok mencit setiap dua hari dibunuh 3 ekor dengan narkose kloroform. Mencit diletakkan dalam posisi telentang, kulit bagian perut dibuka dan dibersihkan selubung peritoneumnya dengan alkohol 70%. Kemudian disuntikkan ± 10 ml medium RPMI dingin ke dalam rongga peritoneum, ditunggu selama ± 3 menit sambil digoyang-goyang secara perlahan. Cairan peritoneal dikeluarkan dari rongga peritoneum dengan cara menekan organ dalam dengan 2 jari, cairan diaspirasi dengan tabung injeksi, dipilih pada bagian yang tidak berlemak dan jauh dari usus. Aspirat disentrifugasi pada 1.200 ppm, 4°C selama 10 menit. Supernatan yang terbentuk dibuang dan kemudian ditambahkan 3 ml medium RPMI pada pelet yang didapat. Jumlah sel dihitung dengan hemositometer dan ditentukan viabilitasnya dengan larutan *trypan blue*, kemudian diresuspensikan dengan medium RPMI sehingga didapat suspensi sel dengan kepadatan $2,5 \times 10^6$ /ml. Suspensi sel yang telah dihitung ditumbuhkan dalam mikrokultur 24 sumuran yang telah diberi *coverslips* bulat, setiap sumuran diisi 200 μ l (5×10^5 sel). Sel diinkubasikan dalam inkubator CO₂ 5%, 37°C selama 30 menit, kemudian ditambahkan medium RPMI sebanyak 1 ml tiap sumuran dan inkubasi dilanjutkan selama 2 jam. Sel dicuci dengan RPMI 2x kemudian ditambahkan medium RPMI 1 ml tiap sumuran dan inkubasi dilanjutkan sampai 24 jam.

Uji fagositosis. Uji kemampuan fagositosis nonspesifik dilakukan *in vitro* menurut Leijh dkk⁶ dengan menggunakan partikel latex diameter 3m. Partikel latex diresuspensikan dalam PBS sehingga didapat konsentrasi $2,5 \times 10^7$ /ml. Makrofag peritoneum yang dikultur sehari sebelumnya, dicuci 2x dengan medium RPMI, kemudian

ditambah suspensi latex 200 μ l/ sumuran, dan diinkubasikan dalam inkubator CO₂ 5%, 37°C selama 60 menit. Sel kemudian dicuci dengan PBS 3x untuk menghilangkan partikel yang tidak difagositosis, dikeringkan pada suhu kamar dan difiksasi dengan metanol absolut. Setelah kering, sel-sel yang melekat pada *coverslips* dipulas dengan Giemsa 20%. Persentase sel yang memfagositosis partikel latex dan banyaknya partikel latex yang difagositosis dihitung dari 100 sel yang diperiksa dengan mikroskop cahaya dengan perbesaran 400x. Dari masing-masing sediaan yang diperiksa dilakukan replikasi 3x.

ANALISIS DATA

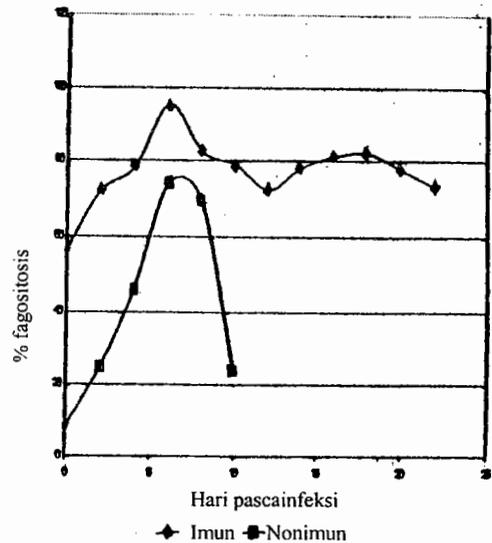
Analisis perbedaan kemampuan fagositosis antara kelompok perlakuan dan kelompok kontrol dilakukan pada setiap periode pengamatan dari hari ke-0 sampai dengan hari ke-10 pasca infeksi dengan uji-t, perbedaan dianggap bermakna jika $p < 0,05$. Untuk memperjelas perbedaan kemampuan fagositosis antara kedua kelompok tersebut dibuat grafik garis hubungan sumbu-X, yaitu waktu pengamatan pasca infeksi dengan sumbu-Y, yaitu persentase sel yang memfagositosis partikel latex dan rerata jumlah partikel latex yang difagositosis oleh 100 makrofag.

HASIL DAN PEMBAHASAN

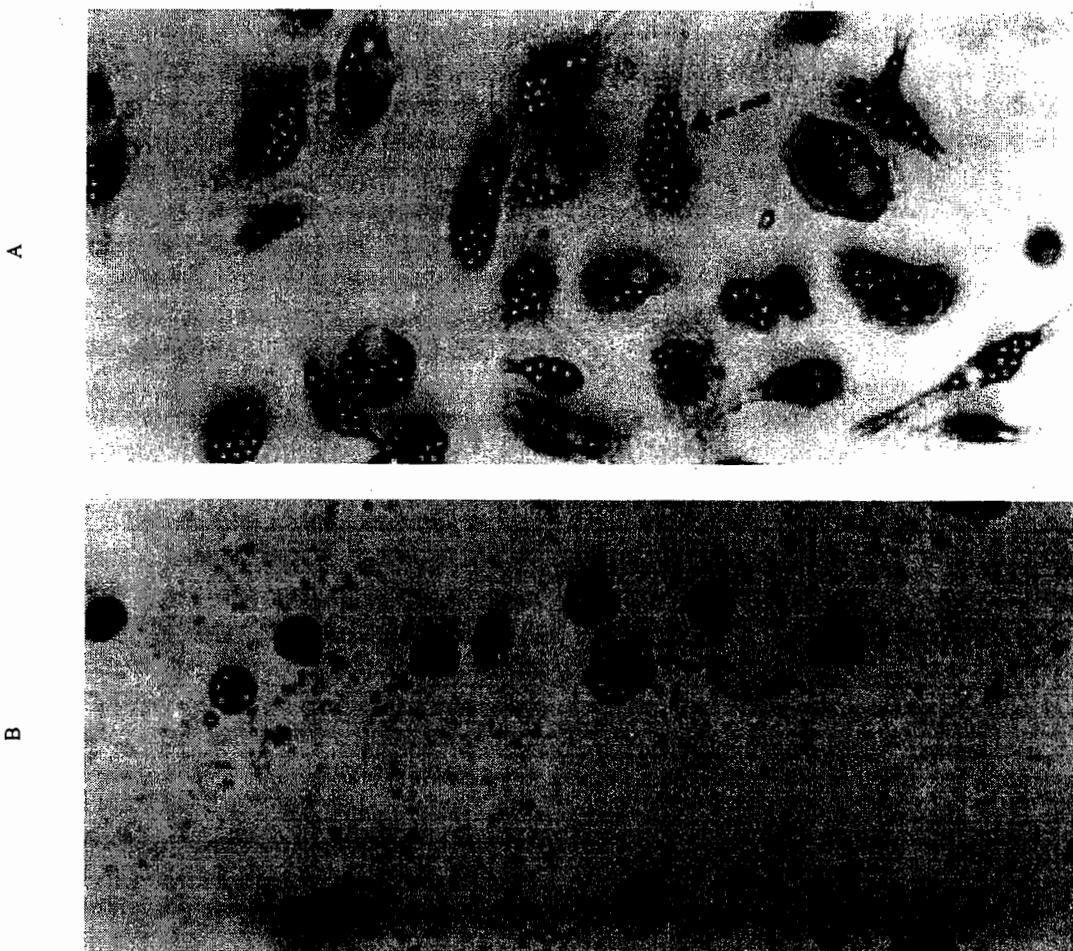
Untuk mengetahui perubahan aktivitas fungsional makrofag peritoneum mencit Swiss yang diimunisasi dan tidak diimunisasi sebagai sel efektor selama infeksi *P. berghei*, dipelajari kemampuannya untuk memfagositosis partikel latex *in vitro*. Kemampuan fagositosis sel makrofag diukur dengan cara menghitung peningkatan jumlah partikel latex intra-sel (GAMBAR 1). Kedua kelompok menunjukkan kemampuan makrofag dalam memfagositosis partikel latex makin meningkat sampai mencapai puncak tertentu diikuti dengan penurunan (GAMBAR 2).

Persentase sel makrofag peritoneum yang memfagositosis partikel latex *in vitro* pada kelompok mencit yang diimunisasi tampak sangat meningkat dibanding kelompok mencit yang tidak diimunisasi pada setiap periode pengamatan. Uji-t menunjukkan perbedaan yang sangat bermakna ($p < 0,01$) hampir pada setiap periode

pengamatan kecuali pada hari ke-8 pasca infeksi yang menunjukkan perbedaan bermakna ($p < 0,05$). Pada kelompok ini puncak peningkatan kemampuan fagositosis terjadi pada hari ke-6 pasca infeksi yaitu $95,39 \pm 1,52\%$ kemudian diikuti penurunan. Puncak kedua terjadi pada hari ke-18 pasca infeksi yaitu sekitar 4 hari sebelum 80% mencit yang diimunisasi mengalami kesembuhan. Keadaan tersebut jika dibandingkan dengan persentase parasitemia selama infeksi tampak puncak kemampuan fagositosis yang pertama terjadi 4 hari sebelum puncak parasitemia sedangkan puncak kedua terjadi 4 hari sebelum parasitemia mulai menghilang dari darah tepi⁷. Jika dibandingkan dengan kelompok kontrol tampak kemampuan fagositosis pada hari ke-0 sudah meningkat 7,3x dan pada saat kemampuan fagositosis mencapai puncaknya terjadi peningkatan sampai 11,7x.

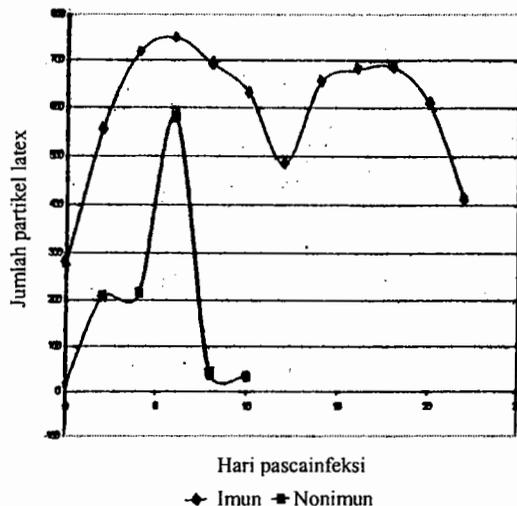


GAMBAR 2. - Persentase makrofag peritoneum mencit Swiss yang memfagositosis partikel latex *in vitro* selama infeksi *P. berghei*.



GAMBAR 1. - Gambaran makrofag peritoneum mencit Swiss yang memfagositosis partikel latex *in vitro* pada hari ke-8 pasca infeksi dengan pemulasan Giemsa pada perbesaran 400x. Tanda panah menunjukkan partikel latex yang difagositosis oleh makrofag. Pada kelompok mencit yang diimunisasi (A) tampak sangat meningkat dibanding kelompok yang tidak diimunisasi (B).

Kemampuan fagositosis pada kelompok mencit yang tidak diimmunisasi meningkat terus dari $8,14 \pm 1,26\%$ pada hari ke-0 sampai mencapai puncaknya pada hari ke-6 pasca infeksi yaitu sebesar $73,89 \pm 2,25\%$ atau 9x dari nilai normal, kemudian diikuti penurunan. Keadaan ini jika dibandingkan dengan persentase parasitemia selama infeksi tampak puncak fagositosis terjadi 4 hari sebelum puncak parasitemia. Persentase parasitemia pada kelompok ini mencapai puncaknya pada hari ke-10 pasca infeksi yang kemudian diikuti dengan kematian semua anggota kelompok⁷.



GAMBAR 3. - Rerata jumlah partikel latex yang difagositosis oleh 100 makrofag peritoneum mencit Swiss *in vitro* selama infeksi *P. berghei*.

Hasil tersebut di atas menunjukkan bahwa kemampuan fagositosis kedua kelompok pada akhir infeksi tampak menurun, hampir sama dengan kemampuannya di awal infeksi. Peningkatan jumlah makrofag peritoneum mencit yang mampu melakukan aktivitas fagositosis selama infeksi *P. berghei* sebanding dengan jumlah partikel latex yang difagositosis. Rerata jumlah partikel latex yang difagositosis oleh 100 makrofag peritoneum pada hari ke-0 untuk kelompok yang diimmunisasi dan tidak diimmunisasi berturut-turut adalah $280,21 \pm 10,81$ dan $15,18 \pm 2,99$ partikel latex. Saat puncak aktivitas fagositosis pada kelompok yang diimmunisasi dapat mencapai $749,0 \pm 41,0$ atau meningkat 49,3x dibanding kemampuannya dalam keadaan normal, sedangkan pada kelompok yang tidak diimmunisasi

$580,63 \pm 8,77$ partikel latex atau meningkat 38,2x (GAMBAR 3).

Hasil tersebut di atas menunjukkan bahwa imunisasi berpengaruh terhadap aktivitas fungsional makrofag untuk memfagositosis partikel latex. Aktivitas fagositosis yang tinggi dari makrofag pada kelompok mencit yang diimmunisasi maupun yang tidak diimmunisasi yang diukur dari kemampuannya untuk memfagositosis partikel latex menunjukkan peran sel tersebut untuk menghilangkan dan membunuh mikroorganisme. Kemampuan tersebut semakin meningkat pada hospes yang diimmunisasi. Pada kelompok mencit yang tidak diimmunisasi, sel makrofag yang memfagositosis partikel latex menurun sejak hari ke-6 sampai ke-10 pasca infeksi kemudian diikuti dengan kematian, sedangkan pada kelompok yang diimmunisasi kemampuan tersebut masih tetap tinggi. Hasil ini memperkuat penelitian Shear dkk⁸ tentang peningkatan aktivitas fagositosis eritrosit yang terinfeksi oleh sel makrofag mencit yang diinfeksi dengan *P. berghei*. Pada penelitian terhadap aktivitas fungsional makrofag selama infeksi *P. berghei* pada mencit SW ditunjukkan bahwa ukuran makrofag limpa sangat meningkat selama infeksi, dari diameter $12,5 \mu\text{m}$ pada keadaan normal menjadi $22,9 \mu\text{m}$ pada hari ke-7, $32,9 \mu\text{m}$ pada hari ke-14 dan $39,1 \mu\text{m}$ pada hari ke-21 pasca infeksi. Aktivitas reseptor Fc dan C3 makrofag yang diuji pada makrofag yang melekat pada gelas benda menunjukkan peningkatan dari 21,0% pada mencit normal menjadi 52,2% pada hari ke-21 pasca infeksi⁹.

Tingginya persentase sel makrofag yang mampu melakukan aktivitas fagositosis pada akhir infeksi pada mencit yang diimmunisasi tampaknya berkorelasi dengan kemampuan mencit mengatasi infeksi *P. berghei*. Persentase makrofag yang memfagositosis partikel latex pada awal infeksi sangat meningkat, kemudian menurun pada akhir infeksi. Keadaan tersebut menunjukkan bahwa pada awal infeksi *P. berghei* terjadi aktivasi makrofag dan tampaknya aktivasi ini kemudian menurun dan mungkin berlanjut dengan supresi. Wyler dkk. (*cit* Brinkmann et al.)¹⁰ menyebutkan bahwa supernatan yang didapat dari kultur makrofag mencit pada awal infeksi baik yang diinfeksi dengan *P. yoelii* maupun *P. berghei* banyak mengandung *lymphocyte-activating factor*, sedangkan pada akhir infeksi

banyak mengandung faktor supresor. Keadaan tersebut mengakibatkan terjadinya aktivitas bifasik metabolisme oksidatif makrofag. Sesuai dengan peningkatan aktivitas makrofag untuk memfagositosis material parasit selama infeksi malaria, akan disekresi faktor pengaktivasi limfosit dengan konsentrasi supernormal, tetapi jika material parasit yang difagositosis terlalu banyak maka akan disekresi subnormal serta disekresikan pula substansi lain yang bersifat immunosupresif¹¹. Mencit yang diinfeksi malaria akan mengalami disfungsi makrofag akibat dilusi fungsi makrofag karena akumulasi makrofag immatur selama infeksi, aktivitas supresif makrofag, dan kegagalan dalam pengenalan antigen. Sedangkan, pada limfosit T terjadi defek sintesa IL-2¹².

SIMPULAN

Berdasarkan hasil tersebut di atas dapat disimpulkan bahwa kemampuan fagositosis *in vitro* sel makrofag peritoneum mencit Swiss yang diimunisasi selama infeksi *P. berghei* lebih tinggi secara bermakna daripada makrofag peritoneum mencit yang tidak diimunisasi.

SARAN

Untuk lebih memperkuat hasil penelitian ini perlu dipelajari aktivitas fagositosis makrofag *in vivo* dan berbagai aktivitas fungsional makrofag sebagai sel efektor lainnya yang berperan dalam imunitas protektif terhadap infeksi malaria.

KEPUSTAKAAN

1. Wyler DJ & Brown J. Malaria antigen-specific T-cell responsiveness during infection with *Plasmodium falciparum*. Clin Exp Immunol. 1997; 29: 401-407.
2. Kabilan L, Sharma VP, Kaur P, Ghosh SK, Yadav RS & Chauhan VS. Cellular and humoral immune responses to Well-Defined Blood stage antigens (major merozoite surface antigen) of *Plasmodium falciparum* in adults from an Indian Zone Where Malaria is endemic. Infection and Immunity. 1994; 62(2): 685-691
3. Lewis CE & McGee JO'D. The Natural Immune System. The Macrophage. New York: Oxford University Press, 1992.
4. Supargiyono. Production, proliferation and functional activities of mononuclear phagocytes during *Plasmodium vinckei petteri* infection in Mice. Ph.D [Thesis]. London: King's College, 1993.
5. Playfair JHL, Jones KR & Taverne J. Cell-mediated immunity and its role in protection. In: Stevenson, MM. Editor. Malaria: Host Responses to Infection. Florida: CRC Press. Inc. Boca Raton, 1989:65-86.
6. Leijh PCJ, Furth RV, & Zwet TLV. In vitro determination of phagocytosis and intracellular killing by polymorphonuclear and mononuclear phagocytes. In: Weir DM, Editor. Cellular Immunology, Vol 2, London. Blackwell Scientific Publication. 1986: 74-85.
7. Mahardika AW, Supargiyono, Noerhajati S dan Loeki, Enggar fitri. Pengaruh imunisasi mencit dengan parasit stadium eritrositik terhadap infeksi Plasmodium berghei. BIKed. 1997; 29(2): 53-9.
8. Shear HL, Nussenweig RS, Bianco C. Immune phagocytosis in murine malaria. J Exp Med. 1979;149: 1288.
9. Shear HL. The role of macrophages in resistance to malaria. In: Stevenson, MM editor. Malaria: Host Responses to Infection, Boca Raton Florida. CRC. Press. 1989: 87-108.
10. Brinkmann V, Kaufmann SHE, Simon MM, & Fischer H. Role of macrophages in malaria: O₂ metabolite production and phagocytosis by splenic macrophages during lethal *Plasmodium berghei* and self-limiting *Plasmodium yoelii* infection in mice. Infection and Immunity 1984; 44(3): 743-46.
11. Wyler DJ, Cellular aspects of immunoregulation in malaria. Bulletin of WHO. 1979. 57(Suppl.1) : 239-243
12. Melankon-Kaplan J, Burns Jr JM, Vaidya AB, Webster HK, Weidanz WP. Malaria. In: Kenneth S Warren editor. Immunology and Molecular Biology of parasitic infection. 3rd ed. New York: Blackwell Scientific Publication, 1993; 302-351.