

Pengaruh imunisasi mencit dengan parasit stadium eritrositik terhadap infeksi *Plasmodium berghei*

Mahardika Agus Wijayanti*, Noerhajati Soeripto*, Supargiyono*, Loeki Enggar Fitri**

* Bagian Parasitologi, Fakultas Kedokteran Universitas Gadjah Mada, Yogyakarta

** Bagian Parasitologi, Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya, Malang

ABSTRACT

Mahardika Agus Wijayanti, Noerhajati Soeripto, Supargiyono, Loeki Enggar Fitri - *The effect of immunization of mice with blood stage parasite against Plasmodium berghei infection*

Immunity against malarial infection is a very complex molecular and cellular interaction and represents a combination of both humoral and cell mediated mechanism. However, which mechanism contributes to the protection effect is still not clear. Immunization against *Plasmodium berghei* infection represents a suitable malarial model to study the host immune responses against malarial infection. The present study was aimed at evaluating the effect of immunization of Swiss mice challenged with *P. berghei* on the blast transformation, prepatent period, parasitemia and mortality of the host. The result showed that *P. berghei* infection in Swiss mice was acute and fatal. All non-immunized mice died following challenge with 1×10^8 parasite on day 8 - 10 post infection. Blast transformation of splenic lymphocyte was higher in immunized mice than in non-immunized mice. Immunization with *P. berghei* and adjuvant in Swiss mice could evoke partial immunity to homolog parasite. Longer prepatent period, reduced parasitemia and decreased mortality were observed in this group. Eighty percent of immunized mice survived from *P. berghei* infection.

Key Words : malarial immunity - immunization - blast transformation - prepatent period - parasitemia - mortality

ABSTRAK

Mahardika Agus Wijayanti, Noerhajati Soeripto, Supargiyono, Loeki Enggar Fitri - *Pengaruh imunisasi mencit dengan parasit stadium eritrositik terhadap infeksi Plasmodium berghei*

Imunitas terhadap infeksi malaria merupakan interaksi antara reaksi molekuler dan seluler yang sangat kompleks yang merupakan kombinasi antara mekanisme imunitas humoral dan seluler. Namun demikian dari dua mekanisme tersebut, mekanisme mana yang berperan protektif masih belum jelas. Imunisasi terhadap infeksi *Plasmodium berghei* merupakan model yang cocok untuk mempelajari respon imunitas hospes terhadap infeksi malaria. Penelitian ini bertujuan untuk mengevaluasi pengaruh imunisasi pada mencit Swiss yang diinfeksi dengan *P. berghei*. Efek imunisasi yang dievaluasi meliputi transformasi blast, periode prepaten, parasitemia dan mortalitas hospes. Hasilnya menunjukkan bahwa infeksi *P. berghei* pada mencit Swiss bersifat akut dan fatal. Semua mencit yang tidak diimunisasi mati setelah diinfeksi dengan 1×10^8 parasit pada hari ke-8 - 10 pasca infeksi. Transformasi blast limfosit limpa mencit yang diimunisasi ternyata hasilnya lebih tinggi daripada yang tidak diimunisasi. Imunisasi dengan *P. berghei* ditambah *adjuvant* pada mencit Swiss ternyata dapat memacu timbulnya imunitas parsial terhadap parasit yang homolog. Periode prepaten yang panjang, parasitemia rendah dan penurunan angka mortalitas terjadi pada kelompok yang diimunisasi dengan *adjuvant*. Delapan puluh persen mencit yang diimunisasi dapat sembuh dari infeksi *P. berghei*.

(B.I.Ked. Vol. 29, No. 2:53-59, Juni 1997)

PENGANTAR

Program pemberantasan malaria di Indonesia sampai saat ini masih menghadapi berbagai ken-

dala di antaranya adalah akibat semakin meluasnya plasmodium yang resisten terhadap obat anti malaria dan nyamuk vektor yang resisten terhadap berbagai insektisida. Salah satu alternatif untuk menjembatani masalah tersebut adalah tindakan pencegahan terhadap terjadinya infeksi malaria dengan imunisasi. Vaksin malaria yang secara efektif dapat melindungi tubuh terhadap infeksi dan komplikasi malaria sampai saat ini masih belum ditemukan^{1,2}.

Vaksin malaria yang sudah pernah dibuat adalah vaksin terhadap 3 stadium perkembangan plasmodium yaitu vaksin terhadap sporozoit, vaksin terhadap parasit stadium eritrositik bentuk aseksual dan bentuk seksual³. Vaksinasi terhadap parasit malaria dapat menginduksi respon imun hospes dengan 2 cara yaitu pengenalan antigen spesifik parasit oleh hospes dan peningkatan respon imun non-spesifik dari adjuvant yang digunakan. Respon imun hospes terhadap imunisasi tersebut meliputi respon imunitas humoral dan selular. Adanya respon imunitas humoral dapat diketahui dari titer antibodi yang disekresi. Respon imunitas selular diperankan oleh limfosit T dan sel-sel efektor yang diaktifkan. Respon tersebut di antaranya dapat diketahui dari respon proliferasi limfosit dan peningkatan aktivitas makrofag sebagai sel efektor pasca imunisasi. Kedua respon imun tersebut akan berefek pada manifestasi klinis yang ditimbulkan jika terjadi infeksi malaria pada hospes yang sudah diimunisasi^{4,5}.

Berbagai metode imunisasi sudah pernah dicoba pada beberapa binatang percobaan dengan tujuan untuk mendapatkan proteksi yang optimal terhadap infeksi malaria. Imunisasi biasanya dilakukan secara berulang-ulang baik dengan parasit hidup, parasit yang sudah dimatikan atau fragmen parasit. Prosedur imunisasi kadang-kadang perlu penambahan *adjuvant* untuk meningkatkan efek vaksin. Vaksin malaria stadium eritrositik digunakan untuk menghambat perkembangan plasmodium stadium eritrositik. Gejala klinis malaria yang muncul disebabkan oleh parasit stadium eritrositik, melalui produk-produknya yang bersifat antigenik maupun toksik. Vaksin stadium eritrositik ditujukan untuk menghambat pertumbuhan dan perkembangan parasit di dalam eritrosit, serta mengurangi manifestasi klinis yang timbul. Vaksin tersebut umumnya hanya menyebabkan reduksi parsial parasitemia⁶.

Respon hospes terhadap infeksi malaria merupakan reaksi yang sangat kompleks yang melibatkan respon imunitas humoral yang diperankan oleh antibodi dan imunitas selular yang diperankan oleh limfosit T dan sel-sel efektor yang diaktivasi oleh limfosit T^{5,7,8}.

Salah satu cara untuk mengetahui respon imun dari hospes yang diperankan oleh limfosit T adalah dengan uji transformasi blas. Limfosit bila dipacu dengan antigen akan mengalami aktivasi dan menghasilkan limfokin. Berbagai limfokin telah dapat diidentifikasi antara lain interferon (IFN-), interleukin-1 (IL-1) sampai IL-13 dan *granulocyte macrophage colony stimulating factor* (GM-CSF)⁹. Limfosit yang terstimulasi akan mengalami perubahan biokimiawi maupun morfologi. Secara biokimiawi terjadi pertambahan kecepatan metabolisme oksidatif, sintesis protein dan RNA. Setelah 2-4 jam protein spesifik yang diduga meregulasi proliferasi mulai terdeteksi dalam inti. Secara morfologis terjadi perubahan yang disebut transformasi blas dengan tanda-tanda diameter sel bertambah, kromatin menjadi longgar dan terpulas pucat. Dalam waktu 8-12 jam perubahan ini sudah dapat dilihat dengan mikroskop cahaya sebagai limfoblas¹⁰. Dengan demikian transformasi blas dapat dipakai sebagai penanda bahwa limfosit terpacu oleh mitogen atau antigen.

Plasmodium berghei adalah hemoprotzoa yang menyebabkan penyakit malaria pada rodensia, terutama rodensia kecil. Penelitian berbagai aspek imunologis malaria banyak menggunakan *P. berghei* dan mencit sebagai hospesnya, karena dengan model ini ada kemungkinan dilakukan manipulasi pada hospes sehingga dapat dipelajari perubahan imunologis yang terjadi selama infeksi malaria¹¹. Pada penelitian ini dipelajari pengaruh imunisasi dengan parasit stadium eritrositik terhadap infeksi *P. berghei* pada mencit Swiss. Efek imunisasi yang diamati meliputi proliferasi sel limfosit limpa, periode prepaten, parasitemia dan angka mortalitas.

BAHAN DAN CARA

Parasit

Plasmodium berghei galur ANKA yang didapat dari NAMRU-2 Jakarta, dibiakkan dalam mencit Swiss di laboratorium Parasitologi Fakul-

tas Kedokteran Universitas Gadjah Mada Yogyakarta.

Hewan coba

Mencit Swiss betina yang berumur 6-8 minggu dipilih secara acak. Mencit dipelihara dalam sangkar besi berukuran 50 x 30 x 20 cm, tiap sangkar berisi 8 ekor mencit, diberi makan pelet 529 dan diberi minum air secukupnya. Mencit Swiss dibagi menjadi 3 kelompok, masing-masing 8 ekor. Kelompok I adalah kelompok mencit yang diimunisasi dengan *adjuvant* dan diinfeksi dengan 1×10^8 parasit *Plasmodium berghei* stadium eritrositik. Kelompok II adalah kelompok mencit yang diimunisasi tanpa *adjuvant* dan diinfeksi dengan 1×10^8 parasit stadium eritrositik. Kelompok III adalah kelompok mencit yang tidak diimunisasi, diinfeksi dengan 1×10^8 parasit stadium eritrositik.

Pembuatan vaksin

Vaksin *P. berghei* stadium eritrositik dibuat dari darah mencit Swiss yang terinfeksi dengan cara Playfair dkk. *cit* Supargiyono¹². Secara singkat cara tersebut sebagai berikut: darah dari mencit Swiss dengan parasitemia lebih dari 60% diambil melalui pungsi jantung dan ditampung pada tabung yang telah diberi heparin. Kemudian dicuci dengan *Phosphate buffered saline* (PBS) 3X dengan cara disentrifus 3000 rpm, *buffy coat* yang terbentuk dibuang. Eritrosit yang diperoleh dilisiskan dengan cara menambah 40 volume 0,01% saponin (Eastman Ltd.) dalam PBS selama 30 menit pada suhu 37°C. Suspensi parasit yang didapat disentrifus pada 15.000 g selama 5 menit pada suhu 4°C. Pelet yang didapat diresuspensikan dalam PBS dan disentrifus 150 g selama 10 menit pada suhu 4°C. Lapisan atas (berpigmen) yang mengandung parasit dipisahkan dan diresuspensikan dalam 0,6% formalin dalam PBS selama 5 menit pada suhu kamar. Parasit yang diperoleh dicuci 2 X dengan PBS. Parasit kemudian diresuspensikan dalam PBS sehingga didapat konsentrasi 1×10^9 parasit/ml, dan dapat disimpan pada -20°C sampai akan digunakan.

Cara imunisasi

Imunisasi dilakukan dengan menyuntikkan 0,2 ml vaksin *P. berghei* yang mengandung 2×10^8 parasit yang telah dicampur dengan 0,2 ml (FCA)

ke dalam rongga peritoneum mencit. Booster imunisasi dilakukan 2x dengan menyuntikkan vaksin yang dicampur dengan *Freund's incomplete adjuvant* (FICA), dengan selang waktu 2 minggu. Imunisasi tanpa *adjuvant* dilakukan dengan menyuntikkan 0,2 ml vaksin *P. berghei* yang mengandung 2×10^8 parasit ke dalam rongga peritoneum mencit. Booster dilakukan 2x dengan menyuntikkan vaksin yang sama dengan selang waktu 2 minggu.

Penentuan respon imun hospes dengan uji transformasi blas

Isolasi dan kultur limfosit limpa mencit Swiss. Dari 3 kelompok mencit masing-masing kelompok 3 ekor, dibunuh dengan narkose menggunakan kloroform. Mencit diletakkan dengan posisi telentang, kulit dibersihkan dengan alkohol 70%. Kulit bagian perut dan selubung peritoneum dibuka, limpa diangkat dan diletakkan dalam cawan petri diameter 50 mm yang berisi 5 ml RPMI 1640. Limpa dipotong menjadi bagian-bagian kecil. Secara hati-hati limpa dicabik-cabik dengan menggunakan pinset steril untuk mendapatkan suspensi sel tunggal, kemudian dimasukkan ke tabung sentrifus 10 ml. Untuk mendapatkan pelet, sel disentrifus dengan sentrifus Sigma 3K12 pada 1.200 rpm 4°C selama 10 menit. Pelet yang didapat diresuspensikan dalam 2 ml *tris buffered ammonium chlorid* untuk melisiskan eritrosit. Sel dicampur dengan menggunakan pipet dan didiamkan pada suhu ruangan selama 2 menit. Ditambahkan 1 ml *fetal bovine serum* (FBS) pada dasar tabung dengan menggunakan pipet. Suspensi tersebut kemudian disentrifus pada 1.200 rpm 4°C selama 5 menit, dan supernatannya dibuang. Pelet dicuci dengan RPMI 2x dengan cara dipipet berulang-ulang dan disentrifus 1.200 rpm 4°C selama 5 menit. Pelet yang didapat diresuspensikan pada 4 ml medium komplet.

Suspensi sel dikultur pada cawan petri diameter 50 mm dalam inkubator CO₂ 5%, 37°C selama 2 jam. Supernatannya yang berisi sel-sel limfosit diambil dengan menggunakan pipet dan ditampung dalam tabung sentrifus. Supernatan kemudian disentrifus pada 1.200 rpm 4°C selama 5 menit. Supernatannya dibuang dan sel limfosit diresuspensikan dengan medium komplet.

Sel dihitung dengan hemositometer dan ditentukan viabilitasnya dengan *trypan blue* sehingga didapat suspensi sel dengan kepadatan 1×10^6 /ml. *Transformasi blas dan kuantitasi sel dengan dimethylthiazol-diphenyltetrazolium bromide-thiazolyl blue (MTT) assay*. Limfosit dikultur pada *micro plate* 96 dengan volume 100 l/sumuran. Tiap-tiap kelompok dengan replikasi 3x. Ditambahkan mitogen phytohaemaglutinin (PHA) dengan konsentrasi akhir 5 g/ml sebanyak 10 l/sumuran, kemudian diinkubasi pada 37°C , 5% CO_2 , selama 72 jam. Selanjutnya ditambahkan MTT pada masing-masing sumuran dengan konsentrasi 5 mg/ml sebanyak 10 l, dan inkubasi pada 37°C , 5% CO_2 dilanjutkan selama 4 jam. Reaksi dihentikan dengan menambah HCl-isopropanol 0,04M sebanyak 100 l/sumuran. Hasilnya dibaca dengan *ELISA reader* pada OD 550 nm dengan referensi 620 nm.

Cara infeksi

Inokulum disiapkan dengan cara mengencerkan sejumlah darah donor dengan parasitemia 30 - 40% dalam RPMI 1640. Infeksi dilakukan dengan cara menyuntikkan 0,2 ml inokulum yang mengandung 1×10^8 parasit stadium eritrositik ke dalam rongga peritoneum, 2 minggu setelah imunisasi yang terakhir.

Monitoring infeksi

Parasitemia pada mencit diamati setiap 2 hari dengan membuat sediaan apus darah tipis dari ujung ekor dan dipulas dengan Giemsa. Pemeriksaan parasitemia dilakukan dengan mikroskop cahaya pada perbesaran 1000X dengan minyak imersi. Pemeriksaan dipilih pada bagian-bagian yang tiap lapangan pandang mengandung sekitar 200 sel dengan susunan tidak saling menumpuk. Dihitung jumlah eritrosit yang terinfeksi dari 1000 sel eritrosit yang terhitung.

Analisis data

Uji statistik yang digunakan untuk menentukan perbedaan respon proliferasi sel limfosit limpa mencit pada ketiga kelompok adalah analisis varian satu jalan dengan batas kemaknaan 5%. Jika ada perbedaan yang bermakna dilanjutkan dengan uji *Tukey's HSD test*.

Periode prepaten, parasitemia dan mortalitas mencit ditentukan dengan membuat sediaan apus darah tipis setiap 2 hari. Dibuat grafik garis hubungan sumbu-X, (waktu pengamatan pasca infeksi) dan sumbu-Y (persentase parasitemia).

HASIL DAN PEMBAHASAN

Proliferasi sel limfosit

Aktivitas proliferasi dari sel limfosit limpa mencit yang diimunisasi dan tidak diimunisasi diamati dengan melihat reaksi transformasi blas setelah dirangsang dengan PHA.

Uji transformasi blas limfosit limpa mencit Swiss dilakukan 2 minggu setelah imunisasi yang terakhir sebelum diinfeksi dengan *P. berghei* stadium eritrositik. Pertama kali dilakukan uji pendahuluan untuk menentukan kadar mitogen yang optimal yang bisa memacu limfosit untuk berproliferasi pada limfosit limpa mencit normal. Diuji 2 macam konsentrasi PHA yaitu 2,5 g/ml dan 5 g/ml untuk memacu 10^6 suspensi sel limfosit dengan kepadatan 1×10^6 sel/ml.

TABEL 1. - Respon proliferasi limfosit limpa mencit normal yang dipacu dengan berbagai kadar PHA

Kadar PHA	OD					
	Replikasi				Mean	SD
	1	2	3	4		
0 µg/ml	0,175	0,176	0,159	0,171	0,170	0,008
2,5 µg/ml	0,181	0,185	0,177	0,184	0,182	0,004
5,0 µg/ml	0,228	0,258	0,237	0,218	0,235	0,017

Dari hasil uji pendahuluan ini didapat nilai rerata OD dari masing-masing konsentrasi (TABEL 1). Setelah diuji dengan analisis varian satu jalan ternyata terdapat perbedaan yang sangat bermakna antara rerata OD pada *MTT assay* ($F = 39,66$; $p < 0,01$), sehingga dapat dikatakan terdapat perbedaan yang sangat bermakna antara konsentrasi PHA dengan kemampuan limfosit limpa mencit untuk berproliferasi. Jika dilanjutkan dengan uji *Tukey's HSD test* untuk mengetahui perbedaan antar kelompok maka perbedaan yang sangat bermakna terdapat antara kadar PHA 2,5 g/ml dengan PHA 5 µg/ml ($Q = 0,054$; $p < 0,01$) dan antara kelompok kontrol negatif (tanpa PHA) dengan PHA 5 µg/ml ($Q = 0,065$; $p < 0,01$). Antara kontrol negatif dengan PHA 2,5 g/ml tidak ada perbedaan yang bermakna ($Q = 0,012$; $p > 0,05$).

Berdasarkan hasil uji pendahuluan tersebut maka ditentukan kadar PHA 5 g/ml untuk memacu proliferasi sel limfosit limpa mencit Swiss pada ketiga kelompok. Pada kelompok I dan II uji dilakukan 2 minggu setelah imunisasi yang terakhir, sedangkan pada kelompok III dilakukan pada hari ke-0 yaitu sebelum diinfeksi dengan *P. berghei*.

TABEL 2. - Nilai OD pada stimulasi limfosit limpa mencit Swiss dengan PHA 5 µg/ml

Kelompok	Replikasi				Mean	SD
	1	2	3	4		
I	0,343	0,380	0,402	0,385	0,378	0,025
II	0,227	0,268	0,305	0,296	0,274	0,035
III	0,253	0,251	0,251	0,207	0,235	0,022

Keterangan :
 Kelompok I : kelompok mencit Swiss yang diimunisasi dengan *adjuvant*.
 Kelompok II : kelompok mencit Swiss yang diimunisasi tanpa *adjuvant*.
 Kelompok III : kelompok mencit Swiss tanpa imunisasi.

Dari hasil uji transformasi blas pada ketiga kelompok percobaan didapatkan nilai *Mean OD* yang menggambarkan reaksi proliferasi limfosit limpa dari masing-masing kelompok mencit (TABEL 2). Setelah diuji dengan analisis varian satu jalan maka didapatkan perbedaan yang sangat bermakna antara rerata OD ketiga kelompok ($F=28,14; p<0,01$). Jika dilanjutkan dengan uji *Tukey's HSD test* untuk mengetahui perbedaan antar kelompok maka perbedaan yang sangat bermakna terdapat antara kelompok I dan kelompok II ($Q = 0,104; p<0,01$) serta antara kelompok I dan kelompok III ($Q = 0,143; p<0,01$), sedangkan antara kelompok II dan kelompok III tidak ada perbedaan bermakna ($Q= 0,039; p<0,05$).

Peningkatan proliferasi sel pada limfosit limpa mencit yang diimunisasi menunjukkan bahwa pada limfosit terpacu akan terjadi perubahan biokimiawi disertai pembelahan sel. Pada penelitian ini limfosit terpacu oleh PHA yang berperan sebagai mitogen dan selanjutnya limfosit berproliferasi. Pada kelompok mencit yang diimunisasi dengan *adjuvant* terjadi peningkatan yang nyata dari kemampuan proliferasi limfosit. Keadaan tersebut ditunjukkan dari adanya aktivasi dan diferensiasi limfosit pada mencit yang diimunisasi dengan *adjuvant in vitro*. Respon proliferasi limfosit pada mencit yang diimunisasi tanpa *adjuvant* tidak beda bermakna dengan kelompok

mencit yang tidak diimunisasi. Hal ini menunjukkan bahwa vaksin tanpa *adjuvant* kurang imunogenik untuk menstimulasi limfosit. Jayawardena dkk. cit Melankon-Kaplan dan Weidanz⁵, menyebutkan bahwa antigen plasmodium dapat mengaktivasi sel T yang ditandai dengan proliferasi sel T *in vivo* dan *in vitro*. Aktivasi sel T *in vivo* berkorelasi dengan perkembangan imunitas protektif. Hasil penelitian ini sesuai dengan yang dilakukan oleh Taylor dan Sidiqi⁴ terhadap kera *Aotus trivirgatus Owl monkey*. Hasil uji transformasi blas pada kera imun mempunyai nilai *stimulation ratio* (SR) yang lebih tinggi daripada kera kontrol yang tidak diimunisasi.

Periode prepaten, derajat parasitemia dan mortalitas mencit

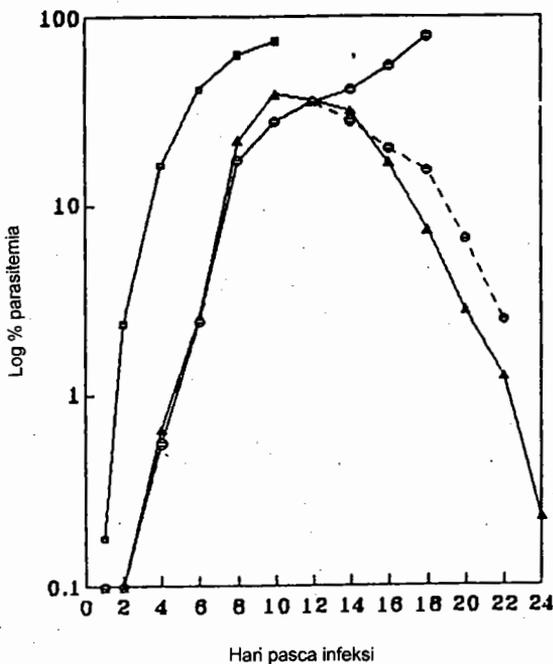
Gambaran apusan tipis darah mencit Swiss yang diinfeksi dengan *P. berghei* sebagian besar berupa bentuk trofozoit yang mengisi 2/3 bagian sel, dan mempunyai kecenderungan untuk menginfeksi eritrosit muda. Trofozoit muda bentuk cincin sering mempunyai 2 inti, trofozoit tua dan schizont muda sitoplasmanya padat, tidak amuboid, schizont masak mengandung 6 - 10 merozoit. Pada mencit yang mengalami penyembuhan banyak ditemukan parasit bentuk krisis atau degeneratif yaitu mulai mengecilnya sitoplasma dengan inti yang terpulas lebih gelap atau gambaran inti yang piknotik. Adanya gambaran parasit bentuk krisis pada pemeriksaan apus darah tepi menunjukkan respon imunitas selular hospes teraktifkan. Makrofag sebagai sel efektor dalam keadaan teraktivasi akan mensekresi berbagai mediator toksik di antaranya *reactive oxygen intermediates* dan TNF yang dapat menyebabkan kematian parasit intraeritrositik⁵.

Infeksi *P. berghei* pada mencit Swiss merupakan infeksi yang akut dan fatal, tetapi pada mencit yang diimunisasi dengan *adjuvant* mampu mengatasi infeksi tersebut dan berakhir dengan kesembuhan pada sebagian besar anggota kelompok. Pada kelompok mencit yang tidak diimunisasi parasitemia sudah dapat terdeteksi pada hari ke-2 pasca infeksi atau periode prepaten kelompok ini adalah 2 hari, diikuti dengan peningkatan parasitemia yang cepat. Kematian pada mencit kelompok ini terjadi sekitar hari ke 8-10 pasca infeksi dengan parasitemia antara 62,47% - 73,59%.



Pada kelompok mencit yang diimunisasi tanpa adjuvant, parasit baru terdeteksi dalam darah tepi pada hari ke-4 pasca infeksi atau periode prepatennya memanjang menjadi 4 hari. Pada kelompok ini parasitemia dari 3 ekor (60%) mencit meningkat mencapai 78,09% pada hari ke-18 pasca infeksi dan ketiganya mati. Sedangkan yang 2 ekor (40%) mengalami penurunan parasitemia dan terbebas dari parasit (sembuh) pada hari ke-22-24 pasca infeksi.

Pada kelompok mencit yang diimunisasi dengan *adjuvant* terjadi perpanjangan periode prepaten sampai 4 hari, kemudian diikuti dengan peningkatan parasitemia yang mencapai puncak pada hari ke-10 pasca infeksi yaitu $38,64 \pm 3,91\%$. Setelah itu terjadi penurunan parasitemia sampai hari ke-24 diikuti dengan kesembuhan pada 80% anggota kelompok (GAMBAR 1).



GAMBAR 1. - Parasitemia mencit Swiss yang tidak diimunisasi (—□—), diimmunisasi tanpa *adjuvant* (—○— dan —○—) dan yang diimmunisasi dengan tambahan *adjuvant* (—▲—) dan diinfeksi dengan 10^8 parasit stadium eritrositik.

Pemeriksaan apus tipis darah tepi pada hari ke-22 - 24 pasca infeksi menunjukkan gambaran parasit bentuk krisis atau degeneratif yaitu mulai

mengecilnya sitoplasma dengan inti yang terpulas lebih gelap atau gambaran inti yang piknotik.

Hampir semua mencit pada kelompok yang tidak diimmunisasi tampak menjadi inaktif pada hari ke 6 - 8 pasca infeksi diikuti dengan tremor, kebingungan dan mati. Pada kelompok mencit Swiss yang diimmunisasi gejala klinis mulai tampak pada hari ke 8 - 10 pasca infeksi, yang makin lama makin menghilang dan diikuti dengan penyembuhan pada 80% anggota kelompok.

Vaksinasi dengan vaksin *crude* yang mengandung 2×10^8 parasit ekstraselular tanpa *adjuvant* secara intraperitoneal pada mencit Swiss ternyata tidak dapat memacu timbulnya imunitas protektif. Efek imunisasi pada kelompok ini hanya memperpanjang periode prepaten sampai 4 hari dan kesembuhan pada 40% anggota kelompok. Tetapi jika vaksin tersebut ditambah dengan *adjuvant* ternyata mampu melindungi 80% anggota kelompok dari kematian. Delapan puluh persen kelompok mencit yang diimmunisasi dengan *adjuvant* menunjukkan parasitemia yang rendah dan akhirnya sembuh. Hasil ini sesuai dengan yang dilakukan oleh Zuckerman *et al. cit* Nussen-zweig dkk¹³ terhadap mencit muda yang diimmunisasi dengan ekstrak *P. berghei*. Resistensi maksimum dicapai setelah pemberian 3 dosis imunisasi, ditandai dengan pemanjangan periode prepaten, parasitemia yang rendah dan penurunan mortalitas. Demikian pula keberhasilan D'Antonio *et al. cit* Nussenweig *et al.*¹³ yang memberikan imunisasi pada mencit A/J dengan ekstrak *P. berghei* stadium eritrositik secara intraperitoneal, ditandai dengan rendahnya parasitemia dan kesembuhan hampir pada semua mencit percobaan.

Menurut Shear¹⁴ imunisasi terhadap infeksi *P. berghei* dan *P. yoelii* pada mencit paling efektif adalah jika ditambah *adjuvant* di antaranya *Bordetella pertussis*. Efek proteksi yang ditimbulkan berhubungan dengan respon antibodi dan hipersensitivitas tipe lambat oleh sel T. Sel T yang teraktivasi akan mensekresi limfokin dan limfokin tersebut akan mengaktivasi sel-sel efektor di antaranya makrofag. Aktivasi sel tersebut dapat dilakukan dengan imunisasi. Makrofag berperan penting untuk mengeliminasi parasit intraeritrositik karena kemampuannya untuk memfagositosis eritrosit terinfeksi dan membunuh parasit baik secara oksidatif maupun non-oksidatif.

KESIMPULAN DAN SARAN

Kesimpulan

Dari hasil penelitian ini dapat disimpulkan bahwa imunisasi dengan vaksin *crude P. berghei* stadium eritrositik dapat memacu respon imunitas selular serta timbulnya resistensi parsial terhadap infeksi parasit yang homolog. Adanya respon imunitas selular dapat dilihat dari peningkatan transformasi blas limfosit limpa mencit yang diimunisasi dengan *adjuvant*. Resistensi parsial terhadap parasit yang homolog dapat dilihat dari pemanjangan periode prepaten, parasitemia yang rendah dan penurunan angka mortalitas.

Saran

Pada penelitian ini vaksin yang digunakan adalah vaksin *crude P. berghei* stadium eritrositik dan *adjuvant* yang digunakan adalah *Freund's complete* maupun *incomplete adjuvant*. Dengan melihat hasil penelitian ini maka perlu dicoba imunisasi dengan cara yang berbeda dan juga dicoba dengan berbagai macam *adjuvant* sehingga diperoleh imunitas protektif yang optimal.

KEPUSTAKAAN

1. Kondrachine AV. Global malaria control strategy an attainable goal, Abstracts, vol.1, XIIIth., International Congress for tropical medicine and malaria, Jomtien, Pattaya, Thailand, 1992.
2. Direktorat Jendral Pencegahan Pemberantasan Penyakit Menular dan Penyehatan Lingkungan Pemukiman. Malaria, DepKes RI, Jakarta, 1991.
3. Tharavanij, Savanat. Malaria vaccine development, an overview, Proceedings of Mahidol University seminar on malaria vaccine development, Bangkok, Thailand, 1988.
4. Taylor DW, Siddiqui WA. A study of cellular and humoral immune responses in owl monkeys (*Aotus trivirgatus*) following vaccination against *Plasmodium falciparum*, Bulletin of the WHO, 1979; 57: 247-253.
5. Melankon-Kaplan J, dan Weidanz WP. Role of cell-mediated immunity in resistance to Malaria, In: Stevenson, MM. (editor), Malaria: Host responses to infection, Boca Raton: C.R.C. Press. Inc., 1989.
6. Melankon-Kaplan J, Burns Jr JM, Vaidya AB, Webster HK, Weidanz WP. Malaria, In: KS Warren (editor), Immunology and molecular biology of parasitic infection, 3rd ed., New York: Blackwell Scientific Publication, 1993: 322.
7. Taylor DW. Humoral immune responses in mice and man to malarial parasite, In: Stevenson MM (editor), Malaria: Host Responses to Infection, Boca Raton: C.R.C.Press. Inc., 1989.
8. Supargiyono. Cell mediated immunity in malaria: Changes in numbers of mononuclear phagocytes during *Plasmodium vinckei petteri* infection in immunized and non-immunized mice, BIKed, FK-UGM, 1995; 27(1): 1-12
9. Mosmann TR, Moore KW. The role of IL-10 in cross regulation of TH1 and TH2 response, Immunology Today, 1991; 12 : A49-A53
10. Parslow TG. Lymphocyte and lymphoid tissue. In: Terr AI, Parslow TG (editors). Basic and clinical immunology, 8th ed. New York: Prentice-Hall International Inc. 1994: 22-39
11. Dewi RM, Sulaksono E. Pengaruh pasase *P. berghei* pada mencit strain Swiss, Cermin Dunia Kedokteran, 1994; 94 : 61-63
12. Supargiyono. Production, proliferation and functional activities of mononuclear phagocytes During *Plasmodium vinckei petteri* Infection in Mice, Ph.D Thesis, King's College London, UK, 1993.
13. Nussenzweig RS, Cochrane AH, Lustig HJ. Immunological responses, In: Killick-Kendrick R, Peters W, Rodent malaria, Academic Press, London, 1978: 248-91.
14. Shear HL. The role of macrophages in resistance to Malaria, dalam Stevenson, M.M., (Ed.), Malaria: Host Responses to Infection, C.R.C.Press. Inc., Boca Raton, Florida, 1989.