



Biosaintifika 6 (1) (2014)

Biosaintifika

Journal of Biology & Biology Education

<http://journal.unnes.ac.id/nju/index.php/biosaintifika>



Peranan Faktor Imun dan Profil Protein dalam Penelitian dan Pengembangan Vaksin Malaria Iradiasi

The Role of Immune Factor and Protein Profile in Research and Development of Malaria Vaccine with Irradiation

✉ Mukh Syaifudin

Pusat Teknologi Keselamatan dan Metrologi Radiasi, BATAN, Indonesia

Info Artikel

Sejarah Artikel:
Diterima Januari 2014
Disetujui Februari 2014
Dipublikasikan Maret 2014

Keywords:

cytokines; immune response; irradiation; malaria vaccine; T-cells

Abstrak

Pengembangan vaksin terhadap malaria yang merupakan penyakit yang mematikan tetap menjadi satu prioritas kesehatan masyarakat global, termasuk pemanfaatan parasit iradiasi sebagai bahan vaksin. Imunisasi dengan sporozoit iradiasi mampu memberikan imunitas protektif pada hewan coba dan sukarelawan. Mekanisme sistem kekebalan tubuh ini banyak dipelajari karena merupakan faktor penting dalam pengembangan vaksin, demikian halnya profil dan/atau ekspresi protein pasca iradiasi yang terkait erat dengan keamanan dan aspek lain dari bahan vaksin. Meskipun telah melalui penelitian yang ekstensif, vaksin yang aman dan protektif belum dapat diperoleh karena masih diperlukan pengetahuan yang lebih mendalam mengenai mekanisme imunitas dan protein dalam litbang malaria. Hasil penelitian menunjukkan bahwa sel limfosit T berperan penting dalam pengaturan respon imun dan pembentukan memori imunologik yang mengontrol dan mengeliminasi infeksi. Sitokin proinflamasi seperti interleukin-12 (IL-12), interferon-gamma (IFN- γ), dan tumor necrosis factor alpha (TNF- α) juga merupakan mediator esensial dari imunitas protektif pada malaria eritrositik. Berbagai pendekatan lain terkait respon imun seperti genetika molekuler saat ini sedang dilakukan. Studi juga menunjukkan bahwa profil protein bergantung pada beberapa faktor yang akan dibahas lebih lanjut dalam makalah.

Abstract

The development of vaccine against malaria as the deadly disease remains the global public health priority; and it includes the use of irradiated parasites as vaccine materials. Immunization with irradiated sporozoites could provide protective immunity in animals and volunteers. The mechanism of this body immunity system has been studied widely due to its important role in the development of vaccines and profiles and/or protein expression post-irradiation which are closely related to safety and other aspects of vaccine materials. Even though extensive research has been done, a safe and protective vaccine remains elusive because more deeply knowledge on immunity mechanism and protein in malaria research is still needed. Results showed that T-cell lymphocytes have an important role in the regulation of immune response and in the formation of immunological memory which controls and eliminates the infection. Pro-inflammatory cytokines such as interleukin-12 (IL-12), interferon-gamma (IFN- γ), and alpha tumor necrosis factor (TNF- α) are also essential mediators of protective immunity in erythrocytic malaria. Various other approaches related to immune response such as molecular genetics has been carried out. The study also showed that protein profile is depended on some factors that will be discussed further in the paper.

© 2014 Universitas Negeri Semarang

✉ Alamat korespondensi:
Jl. Lebakbulus Raya No. 49 Po Box 7043 JKSKL Jakarta Indonesia 12070
E-mail : mukh_syaifudin@batan.go.id

p-ISSN 2085-191X
e-ISSN 2338-7610

PENDAHULUAN

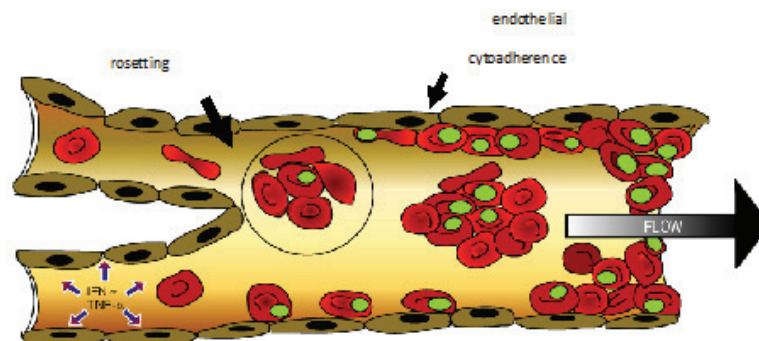
Malaria menyebabkan sekitar 350-500 juta kasus infeksi pada manusia dengan sekitar 1-3 juta kematian per tahun di seluruh dunia. Jika prevalensi malaria terus mengalami peningkatan yang sama seperti saat ini, maka tingkat kematian akan berlipat dua dalam duapuluh tahun mendatang. Malaria ditemukan di lebih dari 100 negara, terutama di daerah tropis dari benua Afrika, Asia, dan Amerika Latin, termasuk Indonesia. Lebih dari 90% kasus malaria dan kebanyakan kematian akibat malaria terjadi di benua Afrika (Joy *et al.*, 2003; TDR, 2007). Berdasarkan *database* Badan Kesehatan Dunia (WHO) tahun 2000, Indonesia menempati urutan ke-26 dengan jumlah kasus 919,8 per 100.000 orang (Globalis Indonesia, 2007).

Penyakit malaria pada manusia disebabkan oleh 4 jenis plasmodium uniseluler yaitu *P. falciparum*, *P. vivax*, *P. malariae*, dan *P. ovale*. Dan satu spesies lain yang diduga menginfeksi manusia melalui Macaca adalah *P. knowlesi* (Cox-Singh *et al.*, 2008). *P. falciparum* paling banyak menyebabkan kematian karena plasmodium ini menghalangi jalan darah ke otak dengan membentuk suatu formasi *rosetting* (pengikatan eritrosit terinfeksi dengan eritrosit tidak terinfeksi) dan sekuestrasi/sitoaderen (pengikatan eritrosit terinfeksi pada sel endotel) dalam sel darah yang menyebabkan koma dan kematian (Clyde, 1975).

Malaria dimulai ketika suatu bentuk *Plasmodium sp.* yang disebut sporozoit dimasukkan ke aliran darah inang vertebrata oleh gigitan vektor nyamuk terinfeksi yang selanjutnya akan menginvasi sel-sel hati dan bertransformasi ke dalam tahap ekso-eritrositik (Clyde, 1975). Sejumlah kecil sporozoit yang lolos dari penghancuran oleh sistem imun akan berkembang biak dalam hati. Sporozoit akan menuju eritrosit dan akan menghasilkan sekitar 40.000 merozoit di dalam sel

ini. Bentuk-bentuk parasit dalam eritrosit adalah *ring* (cincin), trophozoit, schizont dan gametosit. Schizont dapat menyebabkan keadaan fatal pada penderitanya karena dapat menyebabkan reaksi leukosit dan fagosit, sedangkan sporozoit dan gametosit tidak menimbulkan perubahan patofisiologik (Francis & Warrell, 1993). Patofisiologi malaria sangat berhubungan dengan penghancuran eritrosit oleh parasit dan fagositosis eritrosit baik yang mengandung parasit maupun yang tidak mengandung parasit, sehingga menyebabkan anemia dan anoksia jaringan. Hemolisis intravaskular yang terjadi dapat menyebabkan hemoglobinuria (*blackwater fever*) dan gagal ginjal. Di samping itu mediator endotoksin-makrofag yang diduga berasal dari rongga saluran cerna. Parasit malaria dapat melepaskan faktor nekrosis tumor (TNF) yang merupakan suatu monokin dalam darah hewan dan manusia penderita malaria. TNF dan sitokin lain menimbulkan demam, hipoglikemia dan sindrom penyakit pernafasan pada orang dewasa (*adult respiratory distress syndrome*) dengan sekuestrasi sel neutrofil dalam pembuluh darah paru. TNF juga dapat menghancurkan *P. falciparum in vitro* dan dapat meningkatkan perlekatan eritrosit mengandung parasit pada endotelium kapiler. Dan adanya sekuestrasi eritrosit yang terinfeksi parasit membentuk tonjolan-tonjolan pada permukaannya. Tonjolan tersebut mengandung antigen malaria dan bereaksi dengan antibodi dan berhubungan dengan afinitas eritrosit terhadap endotelium kapiler darah dalam organ, sehingga skizogoni berlangsung di sirkulasi organ dalam, tidak di sirkulasi perifer. Eritrosit yang terinfeksi menempel pada endotelium kapiler darah dan membentuk gumpalan (*sludge*) yang membendung kapiler dalam organ-organ dalam (Gambar 1).

Salah satu upaya pencegahan/pengendalian paling tepat pada penyakit infeksi yang mematikan ini adalah vaksinasi, namun sampai saat



Gambar 1. Ilustrasi *rosetting* dan sekuestrasi yang terjadi pada sel darah merah yang terinfeksi *P. falciparum*.

ini belum ditemukan vaksin yang efektif hingga 100% untuk mencegah infeksi malaria. Jumlah kasus yang terbanyak disebabkan oleh *P. falciparum* dan *P. vivax* sehingga vaksin yang mendesak untuk dibuat adalah vaksin untuk mengatasi infeksi oleh kedua jenis plasmodium tersebut yang secara filogenetik dan sifat virulensinya cukup berbeda (Escalante & Ayala, 1994). Hasil pengkajian menunjukkan bahwa imunitas terhadap malaria sangat kompleks karena melibatkan hampir seluruh komponen sistem imun baik imunitas spesifik maupun imunitas non spesifik, imunitas humoral maupun selular yang timbul secara alami maupun didapat (*acquired*). Salah satu sel yang bertanggung jawab terhadap imunitas selular adalah limfosit khususnya sel limfosit T (Nugroho *et al.*, 2000).

Vaksin sangat bermanfaat untuk menurunkan morbiditas dan mortalitas penyakit malaria (Kwiatkowski & Marsh, 1997). Kendala besar dalam pengembangan vaksin adalah kemampuan parasit untuk mengubah antigennya (Gardiner *et al.*, 2005). Vaksin malaria yang efektif harus tepat sasaran yakni mampu mengatasi parasit pada berbagai stadium perkembangannya, menghasilkan respon imun humoral dan selular, dan mengaktifkan sel memori. Dengan demikian vaksin ini harus dapat mengarah ke bentuk-bentuk parasit ekso-eritrositik (tahap hati) dan eritrositik (tahap darah), serta mampu memicu respon imun humoral dan seluler, mengatasi restriksi genetik dan menstimulasi sel memori (Caro-Aguilar *et al.*, 2002). Untuk keberhasilan pengembangan vaksin malaria multi-valent diperlukan identifikasi antigen potensial (Nardin & Nussenzweig, 1993).

Selain respon imun, para peneliti juga mengembangkan metode yang dapat mengungkapkan profil/ekspresi antibodi, merupakan suatu jenis protein, yang muncul setelah vaksinasi dan mengidentifikasi antigen imunoreaktif yang diharapkan dapat digunakan untuk bahan vaksin. Sebagai contoh vektor ekspresi yang mengkode protein *P. falciparum* yang dibuat dengan teknik *polymerase chain reaction* (PCR)/*cloning* rekombinasi. Saat ini telah dikenal teknik canggih yang dikenal sebagai analisis proteomik atau *microarray* yang mampu mengidentifikasi berbagai macam protein terkait imunoreaktivitas. Informasi yang diperoleh dari analisis ini akan mempermudah identifikasi, pencuplikan basis molekuler imunitas, memonitor *outcome* atau keberhasilan uji coba vaksin, dan identifikasi imun terkait proteksi (Doolan *et al.*, 2008). *Cloning* antigen *merozoite surface protein-1* (MSP-1) sebagai imunogen juga menjadi fokus usaha pengembangan vaksin. Fusi MSP-1 dan MSP-3 (suatu *chimeric*) juga menjadi

pemikiran terbaru pengembangan vaksin dan terbukti imunogenik dengan suatu adjuvant.

Protein yang merupakan kelompok biomakromolekul yang sangat heterogen dapat memerankan fungsi sebagai bahan struktural karena, seperti halnya polimer lain, memiliki rantai yang panjang dan juga dapat mengalami *cross-linking* dan lain-lain. Studi efek radiasi terhadap profil protein dalam pengembangan vaksin iradiasi juga berperan sangat penting dimana intensitas (konsentrasi) protein dapat berubah akibat iradiasi sinar gamma, demikian halnya struktur maupun ikatannya. Perubahan struktur dapat diakibatkan oleh denaturasi dan degradasi protein, maupun perubahan asam deoksiribonukleat (DNA). Perubahan DNA ini dapat menyebabkan peningkatan sintesis protein atau terbentuknya protein baru (Syaifudin, 2005).

Kunci keberhasilan pengembangan vaksin adalah munculnya respon imun dalam inang baik melalui induksi antibodi yang menggeblok infasi parasit maupun memicu sel hati yang terinfeksi untuk melakukan program bunuh diri dan mengurangi sel-sel terinfeksi yang beredar dalam tubuh. Permasalahannya adalah bahwa ternyata untuk menginduksi respon imun ini sangat sulit karena parasit malaria senantiasa merubah protein antigenik yang bergantung pada siklus hidupnya. Sementara suatu vaksin dibuat dari satu antigen sasaran, di lain pihak parasit telah merubah antigennya. Namun demikian ada kemajuan signifikan dalam pengetahuan imunitas ini melalui riset intensif. Satu hal lainnya yang tidak kalah penting adalah berkaitan dengan keamanan bahan vaksin setelah iradiasi yang antara lain dapat ditentukan melalui uji profil dan/atau ekspresi protein parasit sebagai antigen yang dikode oleh banyak gen.

METODE

Untuk uji respon imun humoral dilakukan dengan menggunakan metode *enzyme linked immunosorbent assay* (ELISA) untuk mengukur antibodi dalam serum darah yang terbentuk setelah pemberian vaksin. Uji respon imun juga dapat dilakukan dengan metode *immunofluorescence antibody test* (IFAT) yang prosedurnya sesuai dengan kit komersial yang digunakan. Untuk uji respon imun seluler seperti limfosit T sitotoksik dilakukan dengan teknik ELISPOT. Uji respon imun melalui fagositosis sel terinfeksi dilakukan menggunakan latex dalam kultur sel *in vitro* menurut prosedur standard.

Untuk uji profil protein dilakukan dengan metode *sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide*

gel electrophoresis (SDS-PAGE) menggunakan gel poliakrilamid yang dibuat dengan mencampurkan komponen-komponen meliputi *deionized water*, larutan 30% akril-bis-akrilamid, buffer, amonium persulfat 10% dan *tetramethylethylenediamine* (TEMED). Bahan campuran ini dimasukkan dalam suatu plat kaca yang telah dirangkai sedemikian sehingga diperoleh gel poliakrilamid dengan tebal 1 mm. Setelah diproses awal, sampel dielektroforesis pada gel selama sekitar 70 menit, gel diwarnai dengan Commasie blue, difiksasi dan divisualisasi untuk mengetahui profil protein.

Untuk litbang vaksin malaria iradiasi, bahan vaksin berupa darah terinfeksi parasit *P. berghei* diiradiasi sinar gamma dengan dosis 0, 150, 175 dan 200 Gy. Setelah diiradiasi, darah disuntikkan pada mencit dan kemudian diamati parasitemianya setiap hari dengan membuat apusan darah tipis menurut prosedur standard.

HASIL DAN PEMBAHASAN

Berikut ini dipaparkan hasil-hasil penelitian dan pengembangan vaksin malaria yang telah dilakukan baik di BATAN maupun di luar negeri. Penelitian vaksin terus mengalami kemajuan antara lain melalui *Malaria Vaccine Technology Roadmap* yang bertujuan untuk mempercepat pengembangan vaksin dan diharapkan pada tahun 2025 telah diperoleh vaksin dengan efektivitas lebih dari 80% dengan daya proteksi lebih dari 4 tahun serta aman. Namun pengembangan menemui kendala yang rumit, sehingga berbagai macam pendekatan dicoba seperti pemanfaatan radiasi untuk melemahkan parasit sebagai bahan dasar vaksin (WHO, 2005). Radiasi sinar gamma dapat dimanfaatkan untuk menghasilkan suatu imunogen yang potensial dan dapat menghasilkan antibodi yang optimal dalam menahan serangan infeksi parasit (Hook *et al.*, 2003).

Tiga tahapan berbeda dari siklus hidup parasit merupakan sasaran potensial baik vaksin sub unit ataupun organisme utuh (*whole-organism*). Pertama, pada tahapan pra-eritrositik asimtomatik dimana nyamuk terinfeksi memasukkan sporozoit ke aliran darah inang. Vaksin pra-eritrositik ini akan memicu antibodi melawan sporozoit. Kedua adalah tahapan eritrositik atau darah ketika hepatosit terinfeksi melepaskan merozoit ke aliran darah, dimana tanda-tanda klinis muncul seperti demam, anemia dan gagal ginjal. Vaksin eritrositik akan memproduksi antibodi melawan merozoit. Antibodi protektif diarahkan untuk melawan antigen target polimorfik seperti *P. falciparum erythrocyte membrane protein-1* (PfEMP-1)

(Bull *et al.*, 1998). Ketiga, tahapan seksual ketika merozoit berkembang menjadi gametosit jantan dan betina yang siap diisap nyamuk. Vaksin tahap aseksual atau pencegahan transmisi akan menghasilkan antibodi melawan gametosit.

Perkembangan di bidang imunologi dan biologi molekuler telah menghasilkan berbagai produk vaksin yang kemudian dapat digunakan untuk diagnosis dan pencegahan malaria. Saat ini terdapat beberapa peptida yang menunjukkan potensi protektif pada binatang percobaan dan disebut kandidat vaksin yakni *merozoite surface antigen* (MSA)-1, MSA-2, *apical membrane antigen* (AMA)-1, peptida berulang seperti NANP, EENV. MSA-1, MSA-2 dan AMA-1 merupakan antigen yang diharapkan dapat dikembangkan menjadi vaksin, karena dalam penelitian patogenesis menunjukkan adanya hubungan dengan pertahanan diri terhadap malaria di daerah endemis. Jenis sitokin yang diproduksi dalam suatu individu saat terkena penyakit atau saat terinfeksi parasit dapat menunjukkan sel T yang berperan dalam keadaan tersebut (Ramharter *et al.*, 2003).

Adanya memori imunologik dan transfer imunitas lewat serum atau imunoglobulin juga dapat membentuk kekebalan terhadap malaria. Individu yang sudah terpapar plasmodium dalam waktu yang lama kemungkinan telah membentuk sistem imunitas sehingga gejala infeksi tidak terlalu nyata, walaupun dari analisis apusan darah tebal ditemukan adanya plasmodium. Oleh karena itu prinsip vaksinasi adalah membuat seseorang yang tidak pernah terpapar plasmodium menjadi imun dengan cara memaparkannya pada plasmodium yang dilemahkan. Konsep ini sudah dicoba pada tahun 1970-an dengan melemahkan sporozoit menggunakan radiasi, namun kendala perbedaan spesies plasmodium yang amat bervariasi membuat konsep ini tidak terlalu berkembang pada saat itu (Nussenzweig *et al.*, 1967).

Salah satu kandidat vaksin malaria yang pernah diuji di lapangan adalah RTS,S yang merupakan vaksin rekombinan yang mengandung protein permukaan sporozoit *P. falciparum* dari fase pra-eritrositik yang digabungkan dengan antigen permukaan virus hepatitis B sehingga diharapkan imunogenisitasnya meningkat. Bahan adjuvan yang telah teruji klinis cukup baik imunogenisitasnya adalah monofosforil A dan QS21 (SBAS2). Hasil uji efektivitas kandidat vaksin ini cukup baik, terutama pada anak-anak yang mencapai 53% untuk kombinasi adjuvan AS01E dan 65.2% untuk adjuvan AS02D. Hasil uji kemampuan (*efficacy*) RTS/S yang dikombinasi dengan berbagai adjuvant disajikan dalam Gambar 2 untuk tahun 1995 hingga 2013 (Abath, 2000).

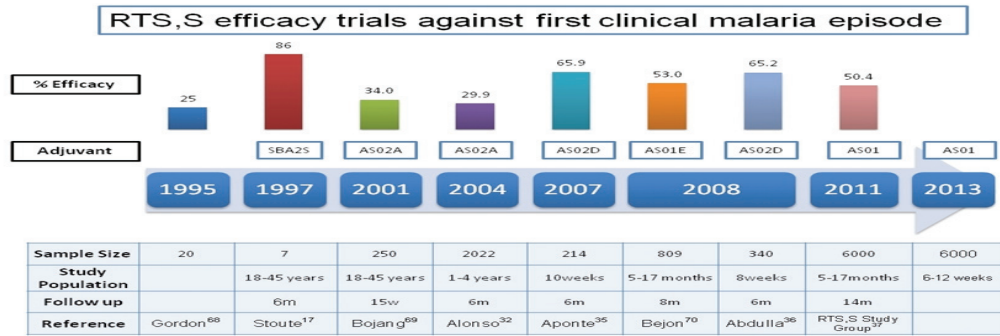


Figure 2. RTS,S efficacy trials against first clinical episode. Note that efficacy point estimates have been assessed at different follow up intervals. This chart includes only the first efficacy results of each project.

Gambar 2. Persentase keampuhan vaksin malaria RTS/S yang dikombinasi dengan berbagai adjuvant pada penderita malaria

Vaksin diberikan dengan tujuan untuk membentuk sistem imun yang kuat. Namun berbeda dengan penyakit akibat virus atau bakteri, imunitas terhadap malaria sangat kompleks, melibatkan hampir seluruh komponen sistem imun baik spesifik maupun non-spesifik, imunitas humoral maupun seluler, yang timbul secara alami maupun didapat (*acquired*), akibat infeksi atau vaksinasi. Kemunculan imunitas spesifik berjalan lambat. Imunitas hanya bersifat jangka pendek (*short lived*) dan kemungkinan tidak ada imunitas yang permanen dan sempurna (Kremsner *et al.*, 1990; Peyron *et al.*, 1994). Antigen-antigen parasit merupakan pemicu pelepasan zat-zat tertentu dari sel-sel imunitas tubuh yang disebut sitokin. Sitokin dihasilkan oleh makrofag atau monosit dan limfosit T. Sitokin yang dihasilkan oleh makrofag adalah TNF, IL-1 dan IL-6 sedangkan limfosit T menghasilkan *tumor necrosis factor alpha* (TNF)-alfa, IFN-gamma, IL-4, IL-8, IL-10 dan IL-12. IFN-gamma adalah protein alami yang diproduksi oleh sel dari sistem imun pada sebagian besar vertebrata untuk merespon tantangan benda asing seperti virus atau parasit. Sitokin tersebut dapat berasal baik dari lengan innate atau adaptif dari respon imun (Favre *et al.*, 1997; Stevenson *et al.*, 1995). Adalah penting untuk menentukan kontribusi sitokin tersebut pada imunitas dan patologi infeksi malaria, karena mereka dapat mendukung aspek selama respon pro-inflamasi (Artavanis-Tsakonas & Riley, 2002).

Bentuk atau respon imunologi terhadap malaria dibedakan menjadi tiga kategori yaitu :

a). Imunitas alamiah non-immunologis berupa kelainan-kelainan genetik polimorfisme yang dikaitkan dengan resistensi terhadap malaria. Misalnya hemoglobin S (*sickle cell trait*), hemoglobin C, hemoglobin E, thalasemia α/β , defisiensi glukosa-6 fosfat dehidrogenase (G6PD), ovalositosis herediter, golongan darah Duffy negatif yang

kebal terhadap infeksi *P. vivax*, individu dengan *Human Leucocyte Antigen* (HLA) tertentu.

b). Imunitas non-spesifik (non-adaptive/innate). Sporozoit yang masuk ke dalam darah segera dihadapi oleh respon imun non-spesifik terutama dilakukan oleh makrofag dan monosit, yang menghasilkan sitokin-sitokin seperti TNF, IL-1, IL-2, IL-4, IL-6, IL-8, IL-10 dan langsung menghambat pertumbuhan parasit (sitostatik), membunuh parasit (sitotoksik).

c). Imunitas spesifik. Tanggapan sistem imun terhadap infeksi malaria mempunyai sifat spesies spesifik, strain spesifik, dan stadium spesifik.

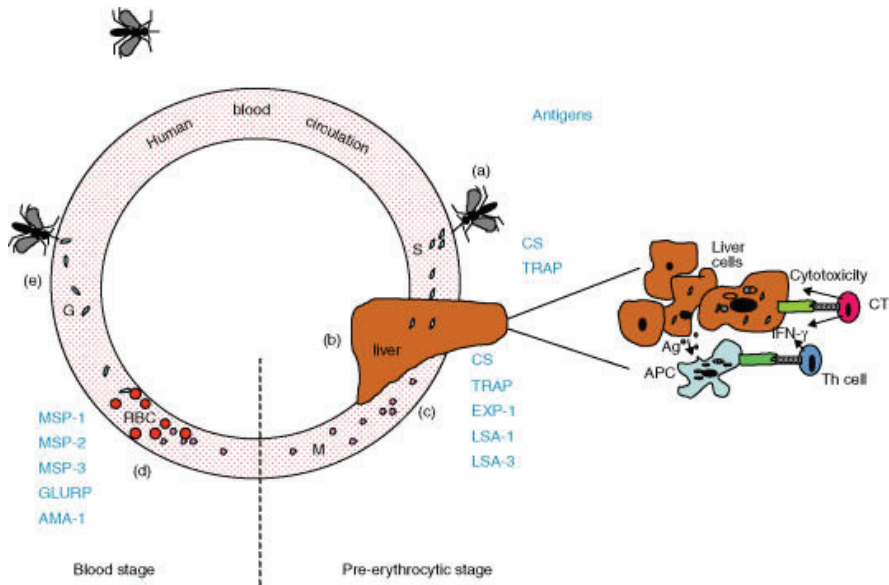
Imunitas terhadap stadium siklus hidup parasit (*stage specific*), dibagi menjadi (Kern *et al.*, 1989) :

- Imunitas pada stadium eksoeritrositer (ekstrahepatik/stadium sporozoit). Respon imun pada stadium ini berupa antibodi yang menghambat masuknya sporozoit ke dalam hepatosit dan antibodi yang membunuh sporozoit melalui opsonisasi. Eksoeritrositer intrahepatik, respons imun pada stadium ini berupa Limfosit T sitotoksik CD8+ dan antigen/antibodi pada stadium hepatosit seperti *liver stage antigen-1*(LSA-1), LSA-2, LSA-3 (Gambar 3).

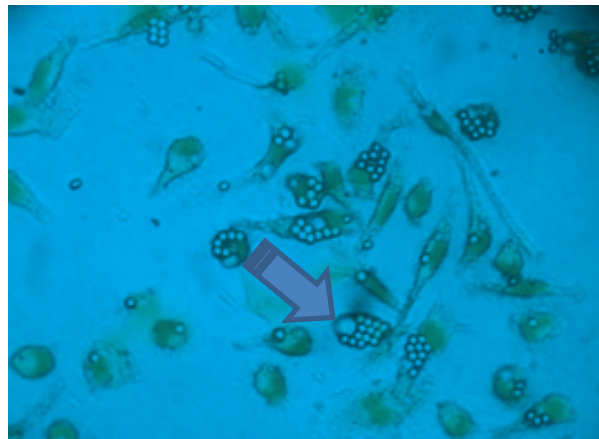
- Imunitas pada stadium aseksual eritrositik berupa antibodi yang mengaglutinasi merozoit, antibodi yang menghambat *cytoadherence*, antibodi yang menghambat pelepasan atau menetralkan toksin-toksin parasit.

- Imunitas pada stadium seksual berupa antibodi yang membunuh gametosit, antibodi yang menghambat fertilisasi, menghambat transformasi zigot menjadi ookinet, antigen/antibodi pada stadium seksual prefertilisasi, dan antigen/antibodi pada stadium seksual post fertilisasi.

Disamping antibodi, limfosit T yang teraktivasi memegang peranan penting dalam infeksi sporozoit intraseluler. Adanya infeksi sporozoit



Gambar 3. Siklus hidup malaria yang menunjukkan antigen yang terekspresi dan suatu representasi mekanisme efektor imun tahap hati, S : sporozoit; M :merozoit; G : gametosit.



Gambar 4. Tampilan mikroskopis makrofag (tanda panah) dalam sel darah yang terinfeksi parasit untuk uji respon imun dalam litbang vaksin malaria iradiasi.

akan merangsang sub set sel T helper, dalam hal ini T *helper* 1 (Th1) untuk mensekresi limfokin yaitu IFN- γ dan TNF- α . Sekresi kedua limfokin ini akan mengaktifasi makrofag, dimana makrofag akan menghasilkan nitrogen oksida dan senyawa lain untuk membunuh parasit. Peningkatan sekresi IFN- γ dan TNF- α oleh aktivasi makrofag dapat meningkatkan reaksi pertahanan tubuh terhadap malaria terutama terhadap sporozoit pada fase ekstra-eritrosit (intraseluler) (Abath, 2000). Respon imun memerlukan bentuk dan target yang cukup untuk melawan antigen yang sesuai, demikian juga dalam hal ekspresi antigennya. Respon imun yang dimediasi sel, terutama sel T CD4⁺ dan CD8⁺, terimplikasikan dalam proteksi

melawan infeksi tahap hati dan antibodi yang terlibat dalam proteksi melawan sporozoit (Todryk & Walther, 2005).

Ada dua macam respon imun yang terjadi apabila ada mikroba yang masuk ke dalam tubuh, yaitu respon *innate* dan *adaptive*. Sel yang berperan dalam *innate response* adalah sel fagosit (neutropil, monosit dan makrofag). Hasil pengamatan makrofag menggunakan latex dalam pengembangan vaksin malaria iradiasi disajikan dalam Gambar 4. Hasil penelitian menunjukkan bahwa fagositosis lebih banyak terjadi pada sel darah menciit yang disuntik parasit *P. berghei* iradiasi dosis 150 Gy (Darlina & Tetriana, 2007).

Profil Protein Pasca Iradiasi

Protein berperan penting dalam patogenesis malaria. Protein di dalam kelenjar ludah nyamuk *Anopheles sp.* dapat berfungsi sebagai imunomodulator dan vasomodulator yang memudahkan nyamuk dalam menghisap darah, dan juga berperan sebagai antigen atau vaksin yang mampu meningkatkan antibodi sistem imun manusia. Hasil penelitian memperlihatkan bahwa terdapat perbedaan profil protein kelenjar ludah antar spesies nyamuk. Di samping itu untuk membuat infeksi, parasit membawa protein virulensi ke dalam sel eritrosit. Protein ini dapat menembus sederet membran sel, termasuk membran parasit, membran *parasitophorous vacuole*, dan membran eritrosit. Peneliti berhasil mengidentifikasi 400 protein eritrositik *putative* yang terkait sekitar 8% gen, dengan 225 protein virulensi dan 160 protein terlibat perubahan dalam eritrosit inang (Marti *et al.*, 2004). Protein tersebut juga berinteraksi satu dengan lainnya.

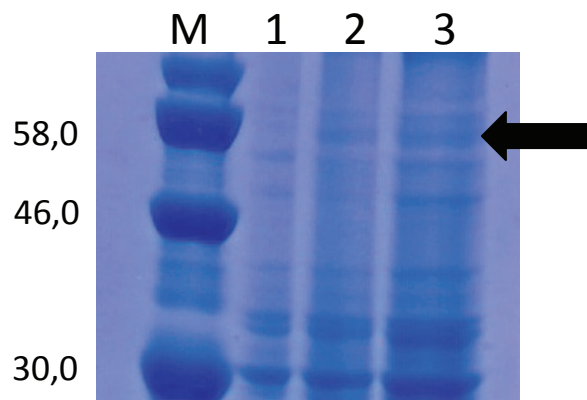
Iradiasi yang digunakan untuk membuat vaksin tentunya memiliki efek pada protein karena dapat menyebabkan agregasi protein alamiah berupa *rearrangement* sub unit penyusunnya dan ikat silang (*crosslinking*) peptida membentuk dimer atau tetramer melalui aksi radikal bebas. Iradiasi gamma mempengaruhi protein dengan merubah konformasi, oksidasi asam amino dan pembentukan radikal bebas protein (Afify & Shousha, 1988). Di samping itu juga terjadi perubahan kimia seperti fragmentasi, agregasi dan oksidasi oleh radikal oksigen hasil radiolisis air. Iradiasi gamma yang optimal memiliki efek yang sedikit pada profil asam amino seperti direkomendasikan untuk makanan oleh Badan Kesehatan Dunia (WHO) tahun 1999. *Rearrangement* molekular akan menyebabkan kondensasi atau polimerisasi,

degradasi, gangguan ikatan hidrogen dan pemutusan ikatan disulfida antar molekul (Dogbevi *et al.*, 1999).

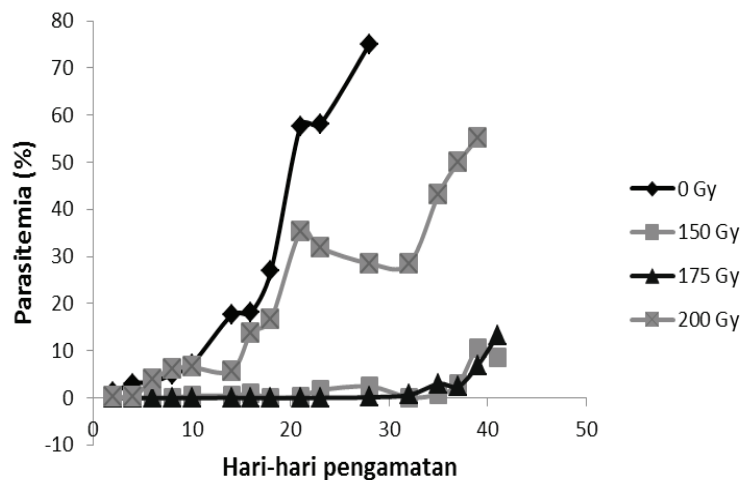
Protein dapat mengalami dua kemungkinan, yaitu pengembangan/pemanjangan rantai peptida dan pemecahan protein menjadi unit yang lebih kecil tanpa disertai pengembangan molekul. Terjadinya kedua jenis denaturasi ini bergantung pada keadaan molekul. Yang pertama terjadi pada rantai polipeptida, sedangkan yang kedua terjadi pada bagian-bagian molekul yang tergabung dalam ikatan sekunder. Degradasi protein dapat menyebabkan protein tersebut kehilangan fungsinya sebagai protein dan degradasi struktur dapat berasal dari hilangnya gugus samping (Syaifudin, 2005).

Hasil penelitian yang telah dilakukan dalam hubungannya dengan litbang vaksin malaria iradiasi berbasis sporozoit di BATAN menunjukkan adanya perbedaan profil protein antara kelenjar ludah *Anopheles sp.* terinfeksi dan tidak terinfeksi. Terdapat penambahan jumlah pita protein pada dosis iradiasi lebih tinggi dimana terdeteksi profil protein sporozoit *P. berghei* (BM 62 kDa), tetapi tidak terdapat perbedaan profil circumsporozoite protein (CSP) antar dosis iradiasi gamma 150 dan 175 Gy (Gambar 5). Hasil tersebut memberikan informasi dasar yang mengarah pada studi lanjut tentang peranan protein sporozoit dalam pengembangan vaksin malaria (Syaifudin *et al.*, 2014). Hasil litbang juga menunjukkan adanya perbedaan profil protein antar laju dosis iradiasi. Lebih banyak ditemukan pita protein baru pada laju dosis iradiasi lebih tinggi (720 Gy/jam) dibandingkan dengan laju dosis rendah (380 Gy/jam).

Hasil litbang profil protein pada darah mencit juga menunjukkan bahwa mencit terin-



Gambar 5. Hasil uji profil protein dari sporozoit *P. berghei* yang diiradiasi gamma dengan dosis 0 Gy (lajur 1), 150 Gy (lajur 2) dan 175 (lajur 3) pada SDS-PAGE. M, marker protein.



Gambar 6. Persentase parasitemia dalam darah mencit pada hari-hari pasca penyuntikan *P. berghei* iradiasi secara intraperitoneal.

feksi parasit berbeda dengan mencit tidak terinfeksi dimana lebih banyak pita terkait infeksi yang menandakan adanya beberapa protein baru (*imported*) dalam sel inang untuk proses patofisiologi malaria, demikian halnya iradiasi yang juga menyebabkan munculnya protein baru. Profil protein juga dipengaruhi oleh persentase parasit (komposisi/tahapan siklus hidup), spesies parasit yang menginfeksi, dosis dan laju dosis iradiasi serta faktor lain (Syaifudin *et al.*, 2013).

Litbang Vaksin Malaria Iradiasi

Pengembangan vaksin malaria iradiasi diawali oleh Nussenzweig *et al.* (1967) dari *Departments of Pathology and Medical and Molecular Parasitology, New York University Medical Center, New York, Amerika Serikat* dimana imunisasi terhadap sukarelawan dengan sporozoit iradiasi mampu melindungi serangan malaria. Studi tersebut menemukan adanya perlindungan hingga 93% (13 dari 14 sukarelawan) dan 94% (33 dari 35) pada ujiantang. Studi intensif serupa juga telah dilakukan oleh banyak peneliti lain.

Pada penelitian menggunakan bakteri oleh Rachmilewitz *et al.* (2004) dan sel ragi oleh Demicheli *et al.* (2006) diketahui bahwa vaksin iradiasi lebih efektif karena mampu menstimulasi respon protektif dari sel imun (sel T) melalui protein *toll-like receptor* dan tidak perlu disimpan dalam ruang dingin berdasarkan beberapa hasil penelitian yang membuktikan tidak ada efek penyimpanan. Meskipun vaksin yang dibuat dengan pemanasan atau kimia lebih aman dan mudah dibuat akan tetapi respon imunnya lebih rendah. Yadev *et al.* (1982) telah membuktikan bahwa pemberian vaksin iradiasi dari parasit rodensia *P. berghei* lebih

dari satu kali dapat memperpanjang masa hidup mencit dan lebih kebal dibandingkan dengan satu kali imunisasi. Sebagai "*state of the art*" dari pengembangan vaksin dengan radiasi sinar gamma adalah penelitian oleh Hoffman *et al.* (2002) yang menyatakan bahwa stadium yang paling efektif untuk mengatasi malaria adalah stadium sporozoit dengan dosis iradiasi gamma antara 150-200 Gy. Dosis radiasi optimum tersebut mampu mengatenuasi sporozoit, mempertahankan kemampuannya memasuki sel hati dan sebagian berkembang biak tetapi mencegah menjadi shizon tahap-hati dewasa, dan oleh karenanya mengeliminir kemampuan menginfeksi eritrosit.

Dengan menggunakan sukarelawan, terbukti bahwa imunisasi dengan gigitan nyamuk terinfeksi *P. falciparum* strain tertentu yang diiradiasi sinar gamma 150 Gy mampu memproteksi tantangan gigitan nyamuk pembawa *P. falciparum* dalam 2-9 minggu. Namun gigitan kurang dari jumlah tertentu dan lebih dari 9 minggu tidak bersifat protektif lagi. Pemberian tantangan kedua pada sukarelawan yang sebelumnya terproteksi juga mampu bersifat protektif hingga 23-42 minggu. Hasil-hasil tersebut menyiratkan bahwa imunisasi dengan ribuan pemajanan terhadap nyamuk pembawa sporozoit dari *P. falciparum* teratenuasi sinar gamma adalah aman dan terdapat toleransi serta mampu bersifat protektif paling tidak selama 42 minggu. Sifat protektif ini diketahui dengan mengamati respon imun dalam tubuh inang setelah ujiantang baik melalui uji ELISA untuk mengetahui antibodi yang terbentuk atau uji sel-T dan IFN-gamma (Hoffman *et al.*, 2002). Hasil penelitian di BATAN menunjukkan bahwa vaksin iradiasi 150 dan 175 Gy mampu menekan

jumlah eritrosit yang terinfeksi parasit pada hari-hari pengamatan dan memperpanjang masa hidup mencit (Gambar 6).

SIMPULAN

Vaksin diperlukan untuk menginduksi timbulnya imunitas humoral maupun seluler untuk mengeliminasi atau mencegah infeksi. Uji profil dan/atau ekspresi protein memainkan peranan penting antara lain untuk menjamin keamanan dan tolerabilitas vaksin terkait dengan kemurnian (*purity*). Uji ini dapat dilakukan dengan beberapa metode, antara lain elektroforesis sampel pada gel poliakrilamid melalui proses SDS-PAGE diikuti pewarnaan gel dengan *Commassie-Blue* atau pewarna lain, ELISA, flow sitometri, dan proteomik. Uji ini dilakukan pada sampel bahan vaksin setelah diiradiasi baik untuk deteksi antigen murni atau kompleks antigen-antibodi yang terbentuk setelah pemberian vaksin. Profil atau ekspresi protein dapat berupa parasit itu sendiri atau hasil rekombinan atau *cloning* dalam suatu sel bakteri seperti *Escherichia coli*. Uji lebih lanjut misalnya adalah *western blot analysis* setelah proses SDS-PAGE untuk karakterisasi atau isolasi antibodi dengan mentransfernya pada membran nitroselulosa. Protein itu sendiri dapat berupa homolog atau heterolog.

DAFTAR PUSTAKA

- Abath, F. G. C. (2000). Development of vaccines against human parasitic diseases: tools, current status and perspectives. *Expert Opinion on Investigational Drugs*, 9(2), 301-310.
- Afify, A. M. R. & Shousha, M. A. (1988). Effect of low-dose irradiation on soybean protein solubility, trypsin inhibitor activity and protein patterns separated by polyacrylamide gel electrophoresis. *J. Agric. Food Chem*, 36(4), 810-813.
- Artavanis-Tsakonas, K. & Riley, E. M. (2002). Innate immune response to malaria: rapid induction of IFN-gamma from human NK cells by live *Plasmodium falciparum*-infected erythrocytes. *J. Immunol*, 169, 2956-2963.
- Bull, P. C., Lowe, B. S., Kortok, M., Molyneux, C. S., Newbold, C. I. & Marsh, K. (1998). Parasite antigens on the infected red cell surface are targets for naturally acquired immunity to malaria. *Natl. Med*, 4, 358-360.
- Caro-Aguilar, I., Rodriguez, A., Calvo-Calle, J. M., Guzman, F., De la Vega, P. & Patarroyo, M. E. (2002). *Plasmodium vivax* promiscuous T-helper epitopes defined and evaluated as linear peptide chimera immunogens. *Infect. Immun.*, 70, 3479-3492.
- Clyde, D. F. (1975). Immunization of man against falciparum and vivax malaria by use of attenuated sporozoites. *Am J Trop Med Hyg*, 24(3), 397-401.
- Cox-Singh, J., Davis, T. M., Lee, K. S., Shamsul, S. S., Matusop, A. & Ratnam, S. (2008). *Plasmodium knowlesi* malaria in humans is widely distributed and potentially life threatening. *Clin Infect Dis.*, 46(2), 165-171.
- Darlina & Tetriana, D. (2007). *Daya infeksi Plasmodium berghei stadium eritrositik yang diiradiasi sinar gamma*. Prosiding Pertemuan Ilmiah PTKMR Jakarta.
- Demicheli, M. C., Reis, B. S., Goes, A. M. & De Andrade, A. S. R. (2006). Paracoccidioides brasiliensis: attenuation of yeast cells by gamma irradiation. *Mycoses*, 49(3), 184-189.
- Dogbevi, M. K., Vachon, C. & Lacroix, M. (1999) Physicochemical properties of dry red kidney Bean proteins and natural microflora as affected by gamma irradiation. *J. Food Sci.*, 4(3), 40-42.
- Doolan, D. L., Mu, Y., Unal, B., Sundaresh, S., Hirst, S. & Valdez, C. (2008). Profiling humoral immune responses to *P. falciparum* infection with protein microarrays. *Proteomics*, 8(22), 4680-4694.
- Escalante, A. A. & Ayala, F. J. (1994). Phylogeny of the malarial genus Plasmodium, derived from rRNA gene sequences. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 91, 11373-11377. USA.
- Favre, N., Ryffel, B., Bordmann, G. & Rudin, W. (1997). The course of *Plasmodium chabaudi chabaudi* infections in interferon-gamma receptor deficient mice. *Parasite Immunol*, 19, 375-383.
- Francis, N. & Warrell, D. A. (Eds). (1993). Pathology and Pathophysiology of human malaria, In : *Bruce Schwatt's Essential Malariaology*, (Eds. Gilles H M and Warrell D A., 3rd Edition). pp 50-59.
- Globalis Indonesia. (2007). Indonesia: Malaria Cases (Online). Retrieved from http://globalis.gvu.unu.edu/indicator_detail.cfm?IndicatorID=74&Country=ID. May 23, (2007).
- Hoffman, S. L., Goh, M. L. & Luke, T. C. (2002). Protection of humans against malaria by immunization with radiation-attenuated *Plasmodium falciparum*. *The Journal of Infectious Diseases*, 185, 1155 - 1164.
- Hook, R. H., Green, T. J. & Stuart, M. K. (2003). Rheumatoid factor-like IgM in *Plasmodium berghei* (Apicomplexa Haemosporida) infections of Balb /C mice. *Folia griculturecal*, 50, 176-182.
- Joy, D., Feng, X. & Mu, J. (2003). Early origin and recent expansion of *Plasmodium falciparum*. *Science*, 300, 318-21, 2003.
- Kern, P., Hemmer, C. J., Damme, J. V., Gruss, H. J. & Dietrich, M. (1989). Elevated tumor necrosis factor alpha and interleukin-6 serum levels as markers for complicated *Plasmodium falciparum* malaria. *American Journal of Medicine*, 87, 139-143.
- Kremsner, P. G., Zotter, G. M., Feldmeier, H., Gran-

- inger, W. & Rocha, R. M. (1990). Immune response in patients during and after *Plasmodium falciparum* infection. *J. Infect. Dis.*, 161, 1025-1028.
- Kwiatkowski, D. & Marsh, K. (1997). Development of a malaria vaccine. *Lancet*, 350, 1696-1701.
- Marsh, K. (1992). Malaria-a neglected disease? *Parasitology*, 104, S53-S69.
- Marti, M., Good, R. T., Rug, M., Knuepfer, E. & Cowman, A. F. (2004). Targeting malaria virulence and remodeling proteins to the host erythrocyte. *Science*, 306(5703), 1930-1933.
- Nardin, E. H. & Nussenzweig, R. S. (1993). T cell responses to pre-erythrocytic stages of malaria: role in protection and vaccine development against pre-erythrocytic stages. *Annu. Rev. Immunol.*, 11, 687-727.
- Nugroho, A., Harijanto, P. & Datau, E. (2000). Imunologi pada Malaria. In: Harijanto PN, editor. *Malaria. Epidemiologi, Patogenesis, Manifestasi Klinis, & Penanganan*, Jakarta, EGC.
- Nussenzweig, R., Vanderberg, J., Most, H. & Orton, C. (1967). Protective immunity produced by the injection of x-irradiated sporozoites of *Plasmodium berghei*. *Nature*, 216, 160-162.
- Peyron, F., Burdin, N., Ringwald, P., Vuillez, J. P., Rousset, F. & Banchereau, J. (1994). High levels of circulating IL-10 in human malaria. *Clinical and Experimental Immunology*, 95,300-303.
- Rachmilewitz, D., Katakura, K. & Karmeli, F. (2004). Toll-like receptor 9 signaling mediates the anti-inflammatory effects of probiotics in murine experimental colitis. *Gastroenterology*, 126, 520-528.
- Ramharter, M., Willheim, M., Winkler, H., Wahl, K., Lagler, H., Graninger, W. & Winkler, S. (2003). Cytokine profile of *Plasmodium falciparum*-specific T cells in non-immune malaria patients. *Parasite Immunol.* 25(4), 211-219.
- Stevenson, M. M., Tam, M. F., Wolf, S. F. & Sher, A. (1995). IL-12-induced protection against blood-stage *Plasmodium chabaudi* AS requires IFN-gamma and TNF-alpha and occurs via a nitric oxide-dependent mechanism. *J. Immunol.*, 155, 2545-2556.
- Syaifudin, M. (2005). Indikator biokimia sel terhadap radiasi pengion. *Buletin ALARA*, 4, 125-131.
- Syaifudin, M., Darlina, Nurhayati, S., Rahardjo, T., Tetriana, D. & Alatas, Z. (2014). Evaluation of immune response in mouse blood post injection with gamma ray-attenuated sporozoites of *Plasmodium berghei*. *US-China Medical Journal*, In press.
- Syaifudin, M., Tetriana, D., Darlina & Nurhayati, S. (2013). Studies on the protein profiles of gamma ray induced blood stage of *Plasmodium berghei* for developing candidate of malaria vaccine. *International Journal of Engineering Research and Application*, 3(1), 314-319.
- Todayk, S. M. & Walther, M. (2005). Building better T-cell-inducing malaria vaccines. *Immunology*, 115(2), 163-169.
- World Health Organization. (1999). *High-dose Irradiation: Wholesomeness of Food Irradiated with Doses above 10 kGy*. WHO, Geneva.
- World Health Organization. (2005). Initiative for Vaccine Research, State the art of vaccine research and development (Online). Retrieved from <http://www.who.int/vaccines-documents>.
- Yadev, M. S., Sekaran, S. D. & Dhaliwal, J. S. (1982). Induction of protection in rats and mice with radiation attenuate *Plasmodium berghei*. In: *Nuclear Techniques in the Study of Parasitic Infections*, Proc. Symp. IAEA Vienna.