

PARASIT MALARIA RODENSIA SEBAGAI MODEL PENELITIAN VAKSIN DENGAN TEKNIK NUKLIR

Darlina

Pusat Teknologi Keselamatan dan Metrologi Radiasi – BATAN

- Jalan Lebak Bulus Raya 49, Jakarta – 12440
- PO Box 7043 JKSKL, Jakarta – 12070
- mdarlina@batan.go.id

PENDAHULUAN

Malaria adalah penyakit infeksi yang penyebarannya di dunia sangat luas meliputi sekitar 100 negara yang beriklim tropis dan sub tropis antara garis bujur 60^o Utara dan 40^o Selatan. Sekitar 3,2 milyar penduduk tinggal di daerah endemis malaria dengan penduduk yang paling berisiko adalah bayi, anak balita dan ibu hamil. Di seluruh dunia setiap tahunnya ditemukan 300–500 juta kasus malaria yang mengakibatkan 1-3 juta orang meninggal dunia. Di negara-negara tropis dan sub tropis, termasuk Indonesia, malaria masih merupakan penyakit endemis. Diperkirakan 50% penduduk Indonesia masih tinggal di daerah endemik malaria. Menurut perkiraan WHO, tidak kurang dari 30 juta kasus malaria terjadi setiap tahunnya di Indonesia, dengan 30.000 kematian. Seiring dengan munculnya galur parasit yang kebal terhadap obat antimalaria dan adanya nyamuk vektor yang tahan terhadap insektisida mengakibatkan peningkatan jumlah kasus malaria di beberapa negara. Di Indonesia resistensi parasit terhadap obat antimalaria yang tersedia, maupun nyamuk yang resisten terhadap insektisida telah terjadi di seluruh provinsi.

Sesuai dengan kesepakatan negara-negara WHO untuk meningkatkan upaya pengendalian malaria, pada tahun 1998 telah disepakati gerakan pengendalian malaria yang intensif secara global yaitu *Roll Back Malaria* (RBM) dan di Indonesia dikenal dengan Gerakan Berantas Malaria (Gebrak Malaria) yang dicanangkan oleh Menteri

Kesehatan pada tahun 2000. Dalam program ini dicanangkan tiga strategi usaha mengontrol malaria yaitu: mengontrol vektor malaria, mengembangkan pemakaian obat antimalaria untuk pencegahan dan pengobatan, dan pengembangan vaksin. Perbaikan selalu dilakukan di ketiga bidang ini, tetapi dengan adanya kemampuan parasite yang tahan terhadap obat baru dan kemampuan vektor nyamuk yang tahan terhadap insektisida, sehingga vaksin terhadap malaria sangat dibutuhkan.

Pada malaria ada beberapa kemungkinan strategi untuk pembuatan vaksin malaria yaitu: 1) Vaksin pre-eritrositik yang dirancang untuk mengaktifkan respon imun untuk membunuh atau melemahkan sporozoit, 2) vaksin stadium darah dengan target merozoit bebas untuk mencegah invasi merozoit ke eritrosit atau sel darah merah yang terinfeksi sehingga dapat mencegah infeksi yang terjadi menjadi penyakit, 3) vaksin penghambat transmisi, yang dibuat untuk menghancurkan bentuk gametosit sehingga dapat mencegah transmisi dari strain resisten yang mungkin lolos dari sistem imun.

Pengembangan vaksin pertama oleh Edward Jenner di Inggris hampir dua ratus tahun yang lalu dan sejak saat itu telah banyak vaksin berhasil guna yang dikembangkan oleh manusia. Pelemahan (atenuasi) mikroorganisma patogen merupakan strategi untuk pengembangan vaksin sejak pertama kali vaksin ditemukan oleh Louis Pasteur. Radiasi gamma dapat digunakan untuk melemahkan mikroorganisma untuk preparasi

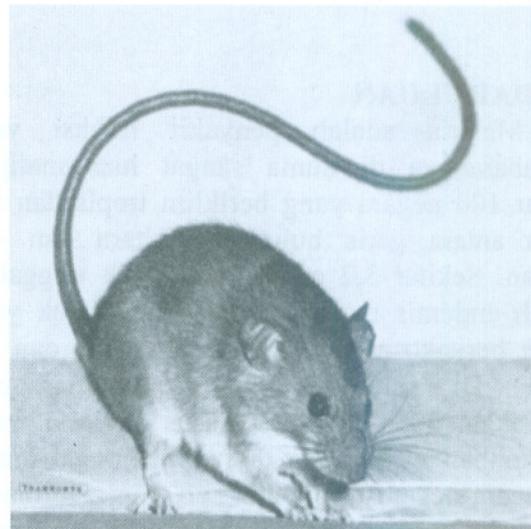
vaksin, disamping metode inaktivasi secara pemanasan atau kimia. Iradiasi gamma digunakan untuk melemahkan parasit malaria dalam stadium darah untuk preparasi vaksin stadium darah, sehingga diharapkan dapat menghambat pertumbuhan dan perkembangan plasmodium di dalam eritrosit yang dapat menyebabkan reduksi parsial parasitemia. Pengembangan vaksin untuk manusia harus melalui beberapa fase dan tahapan penelitian yang cukup panjang sebelum digunakan ke manusia. Studi awal dalam pengembangan vaksin umumnya menggunakan hewan coba kecil umumnya binatang pengerat atau rodensia. Parasit malaria pada rodensia serta mencit sebagai inangnya merupakan model malaria yang umum digunakan dalam tahap awal pengembangan vaksin.

MALARIA RODENSIA

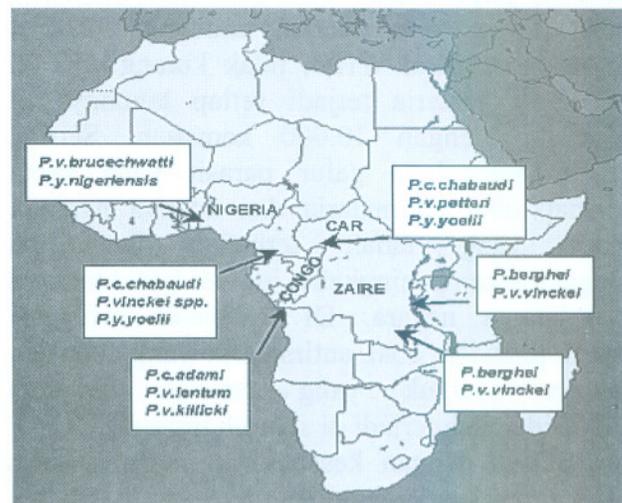
Parasit malaria rodensia pertama kali ditemukan di Zaire pada tikus belukar (“*thicket rats*”) oleh Vincke dan Lips tahun 1948. Hingga saat ini sudah 11 spesies parasit malaria pada rodensia yang ditemukan di daerah Afrika barat (Gambar 1). Tetapi hanya 4 spesies yaitu *P.berghei*, *P.yoelii*, *P.vinckei*, dan *P.chabaudi* yang saat ini sudah digunakan dalam penelitian malaria (Tabel 1), karena siklus morfologi, fisiologi dan kehidupan serta manipulasi siklus hidup parasit ini telah lengkap diketahui

Keempat parasit malaria hewan pengerat diisolasi dari beberapa inang alamiahnya serta vektor alamiahnya yaitu *Anopheles durenii*. Ada perbedaan kecil diantara keempat parasit malaria misalnya perbedaan dalam morfologi, waktu perkembangan dan ukuran parasit pada tahapan yang berbeda dan iso-enzimnya. Karakteristik ini mempengaruhi interaksi parasit dengan inangnya dan perbedaan dalam perjalanan infeksi, virulensi dan patologi. Perbedaan karakter parasit hewan pengerat sangat berguna dalam berbagai bidang penelitian malaria. Sebagai contoh, *P. chabaudi* diakui sebagai spesies yang berguna sebagai model penyelidikan mekanisme resistensi obat dan variasi antigenik. Parasit ini menunjukkan variasi antigenik yang dapat bertahan lama, tidak

mematikan pada tikus laboratorium yang terinfeksi parasit tersebut. Sebaliknya, infeksi *P. berghei* biasanya cepat mematikan tikus laboratorium dan menghambat penelitian di dalam generasi vivo dan pemilihan varian antigenik. *P. yoelii*, yang secara luas digunakan dalam studi pada biologi tahap hati dan antigen darah dan mereka berperan dalam pengembangan vaksin.



(a)



(b)

Gambar 1. *Thamnomys rutilans* (a) salah satu inang alamiah dari parasit malaria rodensia serta daerah tempat ditemukannya (b).

Sejak ditemukannya parasit malaria rodensia oleh Prof Ignace Vincke, lebih dari 30 tahun malaria pada rodensia secara intensif dipelajari dan sebagai hasilnya banyak penelitian dilakukan oleh para peneliti pada parasit malaria rodensia. Alasan mengapa parasit malaria rodensia sangat menarik untuk digunakan dalam penelitian adalah karena parasit rodensia lebih mudah ditangani dan biayanya lebih ekonomis dibandingkan parasit malaria lainnya dan relevan bila dibandingkan parasit malaria pada unggas (*avian*). Selain itu inang parasit rodensia yaitu tikus laboratorium yang termasuk hewan mudah dipelihara dan dikembangkan. Pada saat ini banyak dikembangkan galur inbrida mencit yang dibutuhkan untuk penelitian tertentu misalnya *nude mice*. Model ini memungkinkan untuk melakukan studi aspek imunologis. Selain itu, memungkinkan untuk bekerja dengan klon yang ditandai parasit malaria dan bereksperimen dengan berbagai protokol inokulasi yang berbeda.

P. berghei merupakan tipe strain yang diisolasi dari inang dan vektor alamiahnya (Tabel 1) dan menjadi strain baru dan diberi nama seperti nama teman Vincke yaitu DR. Louis van den Berghe yang sekarang dikenal dengan *P. berghei*. *P. berghei* banyak digunakan dalam penelitian dan pengembangan biologi pada parasit malaria untuk manusia karena sudah tersedianya teknologi pembiakan secara *in vitro* dan pemurnian pada tahapan siklus hidup, pengetahuan pada susunan genom dan pengaturannya. Bahkan hasil analisis molekuler menunjukkan bahwa *P. berghei* mempunyai banyak kesamaan dengan plasmodium yang menginfeksi manusia. Dengan model ini kemungkinan dapat dilakukan manipulasi pada hospes sehingga dapat dipelajari perubahan imunologis yang terjadi selama infeksi malaria. Infeksi oleh *P. berghei* dapat mempengaruhi otak dan dapat menjadi penyebab komplikasi otak pada tikus laboratorium. Gejala-gejala ini untuk tingkat tertentu sebanding dengan gejala malaria serebral pada pasien yang terinfeksi dengan parasit malaria *P. falciparum* karena itu *P.*

berghei banyak digunakan untuk penelitian malaria yang disebabkan parasit tersebut.

Tabel 1. Spesies Plasmodium yang digunakan di dalam penelitian alamiah serta asal isolasi

No.	(Sub) Spesies	Inang asal
	<i>P. berghei</i>	<i>Grammomys surdaster</i> <i>Praomys jacksoni</i> <i>Leggede belle</i>
	Isolat dari <i>P. berghei</i> :	Isolat dari :
	k173	<i>Grammomys surdaster</i>
	SP11	<i>Anopheles durenii</i>
	ANKA	<i>Anopheles durenii</i>
	LUKA	<i>Anopheles durenii</i>
	NK85	<i>Anopheles durenii</i>
	<i>P. yoelii yoelii</i>	<i>Thamomys rutiens</i>
	<i>P. yoelii nigeriensis</i>	<i>Thamomys rutiens</i>
	<i>P. yoelii killick</i>	<i>Thamomys rutiens</i>
	<i>P. chabaudi chabaudi</i>	<i>Thamomys rutiens</i>
	<i>P. chabaudi adami</i>	
	<i>P. vinckei vinckei</i>	<i>Thamomys rutiens</i>
	<i>P. vinckei petteri</i>	<i>Thamomys rutiens</i>
	<i>P. vinckei jentum</i>	<i>Thamomys rutiens</i>
	<i>P. vinckei</i>	<i>Thamomys rutiens</i>
	<i>brucechwatti</i>	

MALARIA RODENSIA SEBAGAI MODEL

Pengembangan vaksin untuk manusia harus melalui beberapa fase dan tahapan penelitian yang cukup panjang sebelum digunakan ke manusia. Tahapan pada pembuatan vaksin secara garis besar dapat dibagi menjadi fase penelitian dan pengembangan di laboratorium, pengujian pra-klinis dan klinis. Fase penelitian dan pengembangan dilakukan dalam laboratorium menggunakan hewan coba kecil umumnya binatang pengerat atau rodensia. Fase praklinis menggunakan hewan coba yang lebih mendekati manusia yaitu primata contohnya *Autos monkey*. Fase klinis dilakukan pada manusia. Tahapan pengembangan vaksin manusia menurut Levine dkk. seperti pada Tabel 2.

Parasit malaria rodensia digunakan dalam banyak lembaga penelitian untuk studi pengembangan vaksin malaria. Di laboratorium, inang alami telah digantikan oleh sejumlah strain mencit laboratorium yang tersedia secara komersial, dan vektornya digantikan oleh nyamuk *Anopheles stephensi*, yang relatif mudah

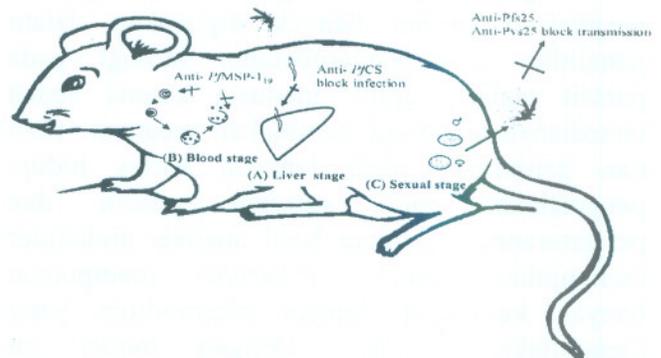
Tabel 2. Tahapan dalam pengembangan vaksin menurut Levine

Tahapan		Objek penelitian	Tujuan
Fase 1 (Riset dan pengembangan)		Binatang rodensia	Identifikasi, kloning dan karakterisasi antigen target, menentukan dosis optimal secara <i>in vitro</i> dan <i>in vivo</i>
Fase 2 (Praklinis)		Binatang primata	Evaluasi keamanan, immunogenitas, dan khasiat dari kandidat vaksin
Fase 3 (klinis)		Manusia (relawan)	Penaksiran khasiat dalam skala besar pada kondisi tantangan alamiah dan untuk menghimpun informasi tambahan untuk keamanan
	Tahap 1	Relawan non-imun daerah non endemik	
	Tahap 2	Relawan imun	
	Tahap 3	Beberapa populasi endemis	
	Tahap 4	Beberapa populasi di daerah endemis dengan skala besar	

dipelihara dan dipertahankan dalam kondisi laboratorium. Parasit rodensia diakui sebagai organisme model yang berharga untuk penelitian vaksin malaria manusia karena mereka mempunyai kesamaan dengan parasit manusia dalam aspek yang paling penting dari siklus morfologi, fisiologi dan kehidupan dan manipulasi siklus hidup parasit ini telah lengkap diketahui, serta tekniknya sederhana dan aman.

Semua parasit malaria pada mamalia, parasit rodensia ditularkan oleh nyamuk Anopheles dan menginfeksi hati setelah disuntikkan ke dalam aliran darah oleh gigitan nyamuk betina yang terinfeksi. Dalam beberapa menit sporozoit akan masuk ke dalam sel hati, bermultiplikasi secara skizogoni (stadium hati/*liver stage*) selama beberapa hari. Kemudian parasit akan meninggalkan hati dan menyerang eritrosit serta memasuki stadium darah/*blood stage*. Perbanyakannya dari parasit dalam darah menyebabkan patologi seperti anemia dan kerusakan organ penting dari inang seperti paru-paru, hati, limpa. Di dalam tubuh nyamuk dan inangnya, Plasmodium mempunyai 4 stadium perkembangan. Setiap stadium perkembangan parasit yang dikarakterisasikan oleh perbedaan ekspresi antigen dan respon imun pada parasit malaria adalah spesifik stadium. Sehingga berdasarkan siklus hidup parasit ada 3 target yang esensial untuk mengembangkan vaksin malaria, yaitu; fase pra-eritrositik (sporozoit, stadium liver), fase eritrositik aseksual dan seksual (Gambar 2). Penelitian dan pengembangan vaksin

malaria meliputi identifikasi dan karakterisasi antigen parasit yang protektif, kloning gen yang sesuai dan dapat diekspresikan pada bakteri, analisis rangkaian nukleotida, dan deduksi rangkaian asam amino pada molekul yang menyandi. Dalam mengidentifikasi antigen plasmodia yang protektif, pengamatan difokuskan pada antigen yang terpapar sistem imun, seperti permukaan parasit atau membran eritrosit yang terinfeksi. Target vaksin yang dipertimbangkan adalah sporozoit, merozoit dan gametosit.



Gambar 2. Siklus hidup parasit malaria dalam tubuh mencit serta respon imun pada setiap stadium.

Vaksin malaria yang ideal diharapkan dapat berfungsi sebagai anti infeksi, anti penyakit, dan penghambat transmisi. Telah diketahui bahwa respon imun pada parasit malaria adalah spesifik stadium. Berdasarkan sasaran antigen yang sesuai dengan stadium perkembangan parasit dan fungsinya, vaksin malaria dapat dibedakan menjadi 3 jenis yaitu: 1) Vaksin pre eritrositik

(vaksin anti infeksi), yang dirancang untuk mendapatkan respon imun yang akan membunuh sporozoit, mencegah sporozoit menginfeksi hepatosit atau menghancurkan hepatosit yang terinfeksi atau membunuh parasit dalam hepatosit. 2) Vaksin eritrositik stadium aseksual (vaksin anti penyakit), dengan target merozoit bebas atau yang berinvansi ke sel darah merah. Vaksin ini dirancang untuk mencegah atau menekan respon patologi inang terhadap parasit. 3) Vaksin eritrositik stadium seksual (vaksin penghambat transmisi), bertujuan untuk menghambat pertumbuhan atau fertilisasi stadium seksual parasit. Vaksin ini tidak memberikan proteksi pada individu secara langsung, tetapi akan memberikan perlindungan terhadap individu lainnya.

TEKNOLOGI IRADIASI UNTUK VAKSIN

Pemanfaatan teknologi radiasi dalam bidang vaksin malaria telah digunakan sejak tahun 1967 oleh Nusszweinzig dengan melakukan iradiasi pada nyamuk. Nyamuk yang telah diiradiasi digigitkan ke mencit percobaan. Setelah dilakukan uji tantang dengan menyuntikkan sporozoit yang hidup ke dalam tubuh mencit, hasilnya 60% mencit mendapatkan proteksi terhadap sporozoit. Percobaan ini merupakan titik awal dari pengembangan vaksin malaria dengan menggunakan teknik nuklir. Stephen Hoffman di USA menyatakan bahwa dosis optimal untuk melemahkan *Plasmodium falciparum* stadium sporozoit adalah antara 150 – 200 Gy.

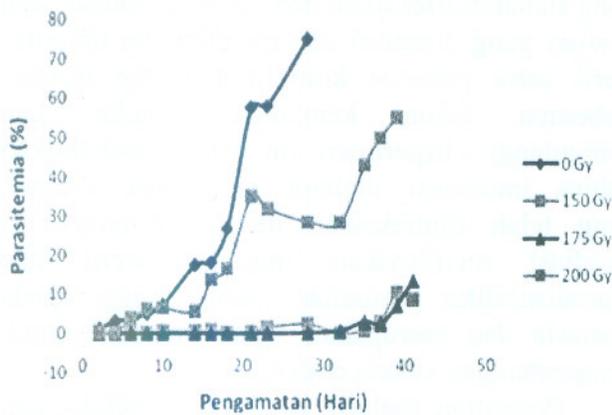
Pengembangan vaksin malaria dimulai pada awal tahun 1960 sejak siklus hidup 2 parasit malaria rodensia yaitu *P.yoelii* dan *P.berghei* sudah lengkap diteliti dan sudah dibuktikan sebagai model laboratorium oleh Jerome Vanderberg dan yoelii sipenemu spesies *P.yoelii*. Sejak saat itu *P.berghei* dan *P.yoelii* merupakan model malaria yang menyediakan dasar eksperimental untuk vaksin malaria hingga saat ini masih digunakan sebagai model malaria.

Pada tahun 1965 Ruth Nussenzweizig berkolaborasi dengan Jerome Vanderberg

melakukan penelitian vaksin sporozoit yang dilemahkan dengan radiasi. Mencit yang diimunisasi dengan sporozoit yang dilemahkan dengan radiasi memberi proteksi terhadap sporozoit yang infeksius. Karakteristik dasar pada proteksi ini bekerja secara spesifik spesies, spesifik stadium (melindungi terhadap uji tantang sporozoit) dan mempunyai respon imun humoral. Serum dari mencit yang memberikan sebuah reaksi presipitasi yang diperantarai antibodi yang dibentuk sporozoit *in vitro* dikenal dengan reaksi *circumsporozoite protein* (CSP). Penelitian selanjutnya membuktikan motilitas sporozoit yang dihambat oleh serum dari mencit yang diimunisasi dan antibodi anti-sporozoit mampu memblok invasi dan infeksi dari sporozoit baik secara *in vitro* maupun *in vivo*. Penelitian berikutnya baru dicobakan ke manusia yang didemonstrasikan oleh paparan gigitan nyamuk yang sudah diinfeksi dengan *P.falciparum* dan *P.vivax* yang diradiasi dan memberikan imunitas steril serta proteksi komplit terhadap infeksi. Beberapa tahun kemudian peneliti lain mengulangi eksperimen ini dan membuktikan bahwa imunisasi melalui gigitannya nyamuk yang telah diinfeksi dengan *P.falciparum* diradiasi memberikan imunitas steril dan reproduibilitas imunitas yang tinggi pada manusia dan merupakan “gold standar” untuk pengembangan vaksin malaria.

Penelitian malaria di BATAN difokuskan pada pengembangan vaksin iradiasi sejak 2005 yang dimasukkan sebagai Sasaran Utama BATAN melalui Usulan Kegiatan Pengembangan teknik deteksi resistensi penyebab penyakit berpola infeksi berbasis teknologi nuklir. Dalam studi awal pengembangan vaksin malaria digunakan parasit malaria rodensia serta mencit sebagai inangnya. Sesuai dengan tuags dan fungsi BATAN, pada penelitian tersebut dilakukan penentuan dosis iradiasi sinar gamma optimal untuk melemahkan parasit sebagai bahan dasar vaksin dengan menggunakan model *P. berghei* stadium eritrositik, dimana daya infeksiya menurun akibat radiasi namun dapat mengaktifkan respon imun mencit.

Pengaruh dosis iradiasi terhadap daya infeksi parasit dievaluasi dari periode prepaten, persentase parasitemia, dan mortalitas mencit. Hasil studi awal menunjukkan bahwa dosis iradiasi 150-175 Gy merupakan dosis yang optimal untuk melemahkan parasit yang ditunjukkan oleh periode prepaten yang panjang, parasitemia dan kematian mencit yang rendah (Gambar 3). Perlakuan *booster* (inokulasi kedua pada dua minggu setelah inokulasi pertama) dengan *P.yoelii* dan *P.berghei* yang diradiasi 150 dan 175 Gy mampu meningkatkan respon imun mencit karena terjadi penurunan densitas parasit dalam darah. Pada penelitian respon imun non spesifik (makrofag, dan limfosit) pada model *P.berghei* menunjukkan dosis 150 Gy memberikan respon imun yang lebih baik dibandingkan 175 Gy.



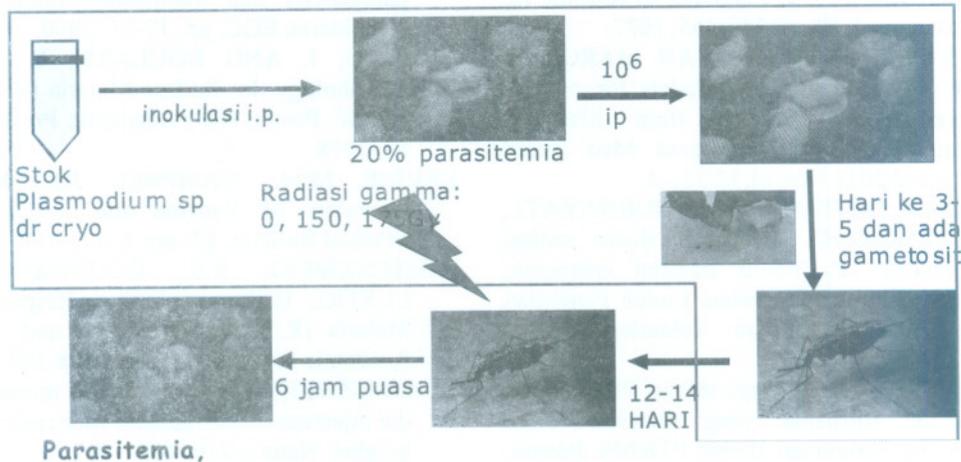
Gambar 3. Profil kepadatan parasit (parasitemia) setelah *booster* dan uji tantangan.

Vaksin stadium sporozoit merupakan kandidat vaksin yang banyak diteliti, bahkan penelitian vaksin malaria pertama yang dilakukan oleh Ruth Nussenzweig dkk menggunakan sporozoit yang dilemahkan dengan radiasi dan memberikan hasil respon imun protektif pada mencit. Stadium sporozoit merupakan stadium awal yang menginfeksi inang sehingga vaksin sporozoit akan memberikan perlindungan yang protektif. Berangkat dari pemikiran mengurangi atau mencegah terjadinya bencana di bidang kesehatan berupa serangan malaria maka

penelitian vaksin yang dibuat dari stadium sporozoit perlu dilakukan di Indonesia dengan mengandalkan keunggulan teknik nuklir dalam melemahkan bahan dasarnya. Pada tahun 2010 melalui program insentif, dilakukan penelitian vaksin sporozoit dengan menggunakan vektor nyamuk anopheles dari Indonesia dengan *P.berghei* dan mencit sebagai model. Di laboratorium vektor yang digunakan adalah nyamuk *Anopheles stephensi* tetapi karena nyamuk tersebut tidak ada di Indonesia maka peneliti di BATAN menggantikannya dengan jenis anopheles asli Indonesia. Jenis anopheles yang digunakan *Anopheles maculatus* yang diperoleh dari B2P2VRP Depkes Salatiga serta *Anopheles farauti* dari Papua. Dalam proses pembuatan vaksin, nyamuk hidup yang mengandung parasit dikelenjar ludahnya diradiasi sinar gamma dosis 125 – 225 Gy untuk melemahkan parasit stadium sporozoit (Gambar 4). Selain itu diikuti sertakan nyamuk yang infeksius yaitu mengandung parasit dan tidak diradiasi sebagai kontrol positif.

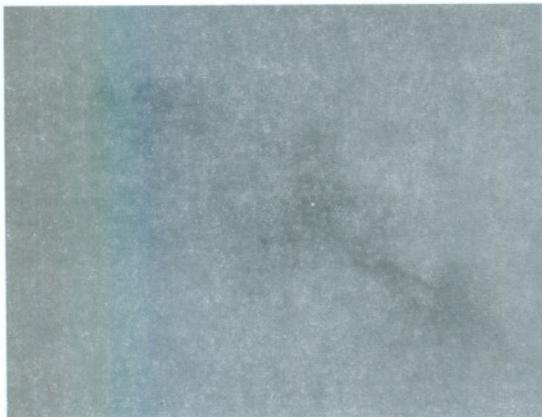
Untuk vaksin sporozoit, setelah diradiasi dilakukan pembedahan kelenjar ludah dibawah mikroskop untuk mengisolasi sporozoit. Hasil penelitian menunjukkan bahwa ketiga nyamuk anopheles asli Indonesia belum menghasilkan sporozoit yang dapat digunakan dalam percobaan vaksin dengan menggunakan model rodensia Sporozoit dari hasil isolasi kelenjar ludah nyamuk kontrol positif teramati di bawah mikroskop tapi tidak cukup banyak untuk menginfeksi mencit (Gambar 5). Hal ini dibuktikan dari uji coba pada satu siklus mencit-nyamuk-mencit menunjukkan tidak terdeteksinya parasit dalam darah mencit.

Dari hasil tersebut di atas dimungkinkan karena nyamuk *Anopheles* sp asli Indonesia bukan vector yang *susceptible* bagi *P. berghei*. Hal ini merupakan satu kendala bagi penelitian pemanfaatan sporozoit sebagai kandidat vaksin karena parasit rodensia tidak dapat digunakan sebagai model. Hal ini dapat diatasi dengan penggunaan insektarian yang cocok/bagus yakni menggunakan nyamuk yang *susceptible* bagi semua jenis *Plamodium* seperti *Anopheles*



Gambar 4. Skema penelitian vaksin sporozoit yang dilakukan di PTKMR-BATAN.

stephensi tetapi hal ini terbentur oleh peraturan depkes yang tidak mengizinkan vector dari luar masuk ke Indonesia.



PENUTUP

Parasit malaria rodensia mempunyai kesamaan dengan parasit manusia dalam aspek yang paling penting dari siklus morfologi, fisiologi dan kehidupan dan manipulasi siklus hidup parasit ini telah lengkap diketahui, serta tekniknya sederhana dan aman. Percobaan menggunakan model rodensia dalam pengembangan vaksin malaria stadium sporozoit telah dilakukan pada tahun 1967 merupakan titik awal dari pengembangan vaksin malaria dengan menggunakan teknik nuklir dinyatakan bahwa dosis optimal untuk melemahkan *Plasmodium falciparum* stadium sporozoit adalah antara 150 – 200 Gy. Pada pengembangan awal vaksin malaria stadium eritrositik di Batan menggunakan dua parasit rodensia yaitu, *P. berghei* dan *P. yoelii* diperoleh kisaran dosis optimal 150 – 175 Gy.

DAFTAR PUSTAKA

ANONIM, Malaria pada manusia, Info Penyakit Menular; Dirjen Pemberantasan Penyakit Menular & Penyehatan Lingkungan, DepKes RI, 2 Desember (2004).
 BARCUS, M.J., LAIHAD, F., SURURI, M., SISMADI, P., MARWOTO, H., BANGS, M.J., and BAIRD, J.K., Epidemic malaria in the Menoreh Hills of Central Java, *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, 66(3), pp. 287-292, 2002.
 BEALE, G.H. et al. Genetics. In: Rodent Malaria (R. Killick-Kendrick and W. Peters, eds.) Academic Press, London, pp. 213-245. 1978.
 BIELLO, D., Irradiated pathogens used to create potent vaccine, *Science News*, July 26, 2006.

- CARTER, R. AND DIGGS, C.L. *Plasmodia of rodents*. In: *Parasitic Protozoa*, vol. III. pp 359-465, 1977.
- CHATTERJEE S, PERIGNON JL, VAN MARCK E, DRUILHE P. How reliable are models for malaria vaccine development? Lessons from irradiated sporozoite immunizations. *J Postgrad Med [serial online]* 2006 [cited 2011 Nov 8];52:321-4.
- DARLINA, TEJA K.,DEVITA T.,SITI NURHAYATI., NANDA WICAKSONO, Pengaruh dosis radiasi terhadap pelemahan *P. Yoelii* stadium eritrositik, Prosiding Pertemuan dan Presentasi Ilmiah Penelitian Dasar Ilmu Pengetahuan dan Teknologi Nuklir Yogyakarta, 2010.
- DARLINA dan TETRIANA, D., Daya infeksi *Plasmodium berghei* stadium eritrositik yang diiradiasi sinar gamma, Prosiding Pertemuan Ilmiah PTKMR Jakarta, 2007.
- DARLINA, TETRIANA, D., RAHARDJO, T., Respon makrofag peritoneal terhadap *Plasmodium berghei* stadium eritrositik yang diiradiasi, Seminar Nasional Keselamatan Kesehatan dan Lingkungan V, Depok, 2009.
- HOFMAN S, GOH L, LUKE T, SCHNEIDER I, Le T, DOOLAN D, SACCI J, DE LA VEGA P, DOWLER M, PAUL C, STOUTE J, CHURCH L, SEDEGAH M, HEPPNER D, BALLOU W, RICHIE T, Protection of human against malaria by immunization with radiation-attenuated *Plasmodium falciparum* sporozoites, *J infect Dist* 185 (8); pp.1155-1164, 2002
- JAFFE RI, LOWELL GH, GORDON DM. Differences in susceptibility among mouse strains to infection with *Plasmodium berghei* (ANKA clone) sporozoites and its relationship to protection by gamma-irradiated sporozoites. *Am J Trop Med Hyg*;42:pp. 309-13, 1990.
- KILLICK-KENDRICK, R. Taxonomy, Zoography and Evolution. In: *Rodent Malaria* (R. Killick-Kendrick and W. Peters, eds.) Academic Press, London, pp 1-52. 1978.
- LAIHAD F.J., SURIADI GUNAWAN, *Malaria di Indonesia*, In; Harijanto (ed); *Epidemiologi, patogenesis dan manifestasi klinis*, Penerbit Buku Kedokteran EGC, pp. 17-25, 2000.
- LANDAU, I. AND BOULARD, Y. Life cycles and Morphology. In: *Rodent Malaria* (R. Killick-Kendrick and W. Peters, eds.) Academic Press, London, pp 53-84. 1978.
- LEVINE M.M., CAMPBEL JD., KOTLOFF KL., Overview of Vaccine and Immunisations, *British Medical Bulletin*, 62: pp. 1 -13, 2002
- NUSSENZWEIG, R.S., COCHRANE, A.H. AND LUSTIG, H. Immunological Responses. In: *Rodent Malaria* (R. Killick-Kendrick and W. Peters, eds.) Academic Press, London, pp 248-307. 1978.
- NUSSENZWEIG R, dkk, Protective immunity produced by the injection of x-irradiated sporozoites of *Plasmodium berghei*. *Nature*, 216, 160, 1967.
- ORJIH AU, COCHRANE AH, NUSSENZWEIG RS. Comparative studies on the immunogenicity of infective and attenuated sporozoites of *Plasmodium berghei*. *Trans R Soc Trop Med Hyg*, 76: pp. 57-61, 1982.
- PLOTKIN, S.L., and PLOTKIN, S. A., A short history of vaccination. In "Vaccine" 3rd ed., S. A Plotkin and W.A. Orenstein, Eds., Philadelphia Saunders, pp. 1-12. 1999.
- SINDEN, R.E. Cell Biology. In: *Rodent Malaria* (R. Killick-Kendrick and W. Peters, eds.), Academic Press, London, pp 85-168. 1978.
- SITI NURHAYATI dan TEJA KISNANTO, Propagasi sporozoit pada nyamuk *Anopheles sp.* Secara in vivo sebagai basis pembuatan vaksin malaria iradiasi, Prosiding Seminar Nasional Bidang Ilmu MIPA (Semirata BKS-PTN B), 2011.
- WORLD HEALTH ORGANIZATION, Initiative for Vaccine Research, State the art of vaccine research and development, <http://www.who.int/vaccines-documents>. 2005,