

HISTOPATOLOGI HATI DAN LIMPA MENCIT PASCA IMUNISASI BERULANG DAN UJI TANTANG DENGAN *Plasmodium berghei* IRADIASI GAMMA STADIUM ERITROSITIK

Tur Rahardjo dan Siti Nurhayati

Pusat Teknologi Keselamatan dan Metrologi Radiasi-BATAN

Jalan Lebak Bulus Raya No.49 Kotak Pos 7043 JKSKL Jakarta Selatan 12070

E-mail: turahardjo@batan.go.id

ABSTRAK

HISTOPATOLOGI HATI DAN LIMPA MENCIT PASCA IMUNISASI BERULANG DAN UJI TANTANG DENGAN *Plasmodium berghei* IRADIASI GAMMA STADIUM ERITROSITIK. Pengembangan vaksin malaria merupakan hal yang cukup penting saat ini seiring dengan meningkatnya resistensi plasmodium terhadap obat anti malaria. Salah satu cara untuk melemahkan plasmodium sebagai parasit penyebab malaria dalam pengembangan vaksin malaria adalah dengan menggunakan radiasi sinar gamma. Beberapa penelitian sebelumnya memperlihatkan bahwa dosis radiasi sinar gamma 175 Gy lebih efektif dalam melemahkan *Plasmodium berghei* stadium eritrositik dibandingkan dengan dosis 150 Gy. Tujuan penelitian yang dilakukan adalah untuk mengetahui efektivitas dosis iradiasi 175 Gy berdasarkan pemeriksaan gambaran histologi organ hati dan limpa mencit pasca imunisasi berulang (booster) dan uji tantang dengan menggunakan *P. berghei* iradiasi 175 Gy. Sebanyak 10 ekor mencit (satu ulangan) diinfeksi dengan *P. berghei* 1×10^7 stadium eritrositik iradiasi 175 Gy. Hari ke 7 dan 14 mencit diinfeksi kembali dengan 1×10^7 *P. berghei* stadium eritrositik yang telah diiradiasi 175 Gy. Hari ke 8 dan ke 16 mencit dibunuh dan diambil organ hati dan limpa untuk dibuat preparat histologinya. Mencit yang tersisa kemudian dipelihara hingga hari ke 40 (satu hari sebelum uji tantang) dan dibunuh satu ekor mencit dan diambil organ hati dan limpanya untuk dibuat preparat histologinya. Hari ke 41 dilakukan uji tantang yaitu dengan menginfeksi *P. berghei* yang tidak diiradiasi sebanyak 1×10^5 terhadap dua ekor mencit yang tersisa. Enam hari pasca uji tantang satu mencit dibunuh untuk dibuat preparat histologi hati dan limpa. Terakhir pada dua puluh satu hari pasca uji tantang mencit dibunuh untuk dibuat preparat histologi hati dan limpanya. Hasil penelitian memperlihatkan bahwa terjadi perbaikan pada struktur hati dan limpa mencit pasca uji tantang. Berdasarkan hasil penelitian dapat disimpulkan bahwa imunisasi berulang (booster) dengan *P. berghei* stadium eritrositik iradiasi 175 Gy memberikan respon imun yang lebih baik pada mencit.

Kata kunci :Histologi, hati, limpa, malaria, imunisasi berulang

ABSTRACT

MICE LIVER AND SPLEEN HISTOPATHOLOGY AFTER REPEATED IMMUNIZATION AND CHALLENGE TEST WITH *Plasmodium berghei* ERYTHROCYTIC STAGE. Development of malaria vaccine is important nowadays with increasing antimalarial drug resistance to plasmodium. One method used to attenuated plasmodium that causes malaria in malaria vaccine development is by gamma radiation. Our previous studies showed that dose 175 Gy of gamma radiation was more effective in attenuating erythricytic stage of *Plasmodium berghei* compared to 150 Gy. Aim of this research was to examine the effectiveness of 175 Gy irradiation dose based on mice liver and spleen histological examination after repeated immunization (booster) and challenge test using *P. berghei* 175 Gy irradiation. A total of 10 mice infected with 1.10^7 erythrocytic stage of *P. berghei* 175 Gy irradiation. Days 7 and 14 mice are infected again and at days 8 and 16 mice were sacrificed and the liver and spleen were taken for histology preparations. The remaining mice were then maintained until day 40 (one day before the challenge test) and then mice were sacrificed and the liver and spleen were taken for histology preparations. At day 41 the challenge test was performed by infecting 1.10^5 *P. berghei* to the two remaining mice. Six days after the challenge test mice were sacrificed and the liver and spleen were taken for histology preparations. Last on twenty one days after

the challenge test mice sacrificed and the liver and spleen were taken for histology preparations. Results showed that structure of mice liver and spleen histology was improved after the challenge test. Based on the results it can be concluded that repeated immunization (booster) with erythrocytic stage of *P. berghei* 175 Gy irradiation gives a better immune response in mice.

Keywords: Histology, liver, spleen, malaria, repeated immunization

PENDAHULUAN

Salah satu kendala dalam pemberantasan penyakit malaria adalah meningkatnya resistensi plasmodium sebagai penyebab malaria terhadap obat anti malaria [1]. Seiring dengan meningkatnya resistensi plasmodium terhadap obat anti malaria, maka pengembangan vaksin malaria menjadi penting dalam penanggulangan penyakit ini [2]. Penggunaan radiasi untuk melemahkan plasmodium dalam pengembangan vaksin malaria merupakan salah satu program penelitian yang strategis untuk penanggulangan penyakit malaria. Keberhasilan dalam melemahkan plasmodium menggunakan radiasi sangat bergantung pada besarnya dosis radiasi yang digunakan [3].

Saat ini penelitian vaksin malaria dilakukan terhadap 3 stadium perkembangan plasmodium yaitu stadium sporozoit, stadium eritrositik bentuk aseksual dan stadium eritrositik bentuk seksual. Vaksin malaria pada stadium eritrositik ditujukan untuk menghambat perkembangan parasit di dalam eritrosit, serta mengurangi manifestasi klinis yang timbul [4]. Hoffman et al. [2002] menyatakan bahwa dosis optimal untuk melemahkan *P. falciparum* stadium sporozoit adalah antara 150 – 200 Gy. Sedangkan dosis radiasi optimal untuk melemahkan plasmodium pada stadium eritrositik belum diketahui [5].

Dalam pembuatan bahan vaksin, jenis radiasi yang biasanya digunakan adalah sinar gamma yang memiliki sifat daya tembus tinggi dan panjang gelombang pendek. Radiasi pengion ini memiliki ciri khusus karena kemampuannya untuk penetrasi sel dan jaringan sehingga memberikan energi pada sel dalam bentuk ionisasi [6].

Beberapa penelitian pendahuluan yang telah dilakukan sebelumnya memperlihatkan bahwa dosis sinar gamma 175 Gy memberikan hasil yang lebih baik dalam melemahkan *Plasmodium berghei* stadium eritrositik dibandingkan dengan dosis 150 Gy [6,7].

Tujuan penelitian yang dilakukan adalah untuk mengetahui gambaran histopatologi hati dan limpa mencit pasca dilakukan imunisasi berulang (*booster*) menggunakan *P. berghei* irradiasi 175 Gy dan uji tantang dengan menggunakan *P. berghei* tidak diirradiasi. Hati merupakan organ target yang memainkan peran kunci dalam siklus parasit malaria. Pemahaman terhadap perkembangan parasit malaria pada organ hati dan limpa dapat memberikan harapan untuk menemukan strategi dalam melawan parasit malaria [8].

Limpa pada penderita malaria berfungsi untuk menghilangkan eritrosit yang terinfeksi dan produknya seperti pigmen malaria dari aliran darah. Plasmodium dan pigmen malaria (*haemozoin*) difagositosis secara aktif oleh makrofag limpa sehingga pada pemeriksaan makroskopis limpa tampak membesar sedangkan secara mikroskopis terdapat peningkatan jumlah sel makrofag dan *haemozoin* yang tersebar [1]. Limpa juga berperan dalam menurunkan persentase parasitemia [9].

BAHAN DAN METODE

Parasit Malaria

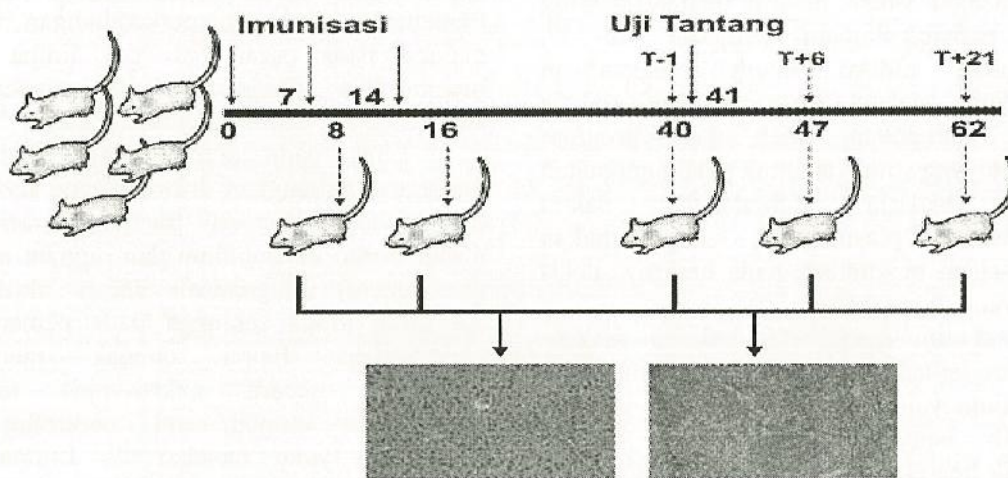
Parasit yang digunakan adalah *Plasmodium berghei* galur ANKA. *Plasmodium berghei* diperoleh dari Lembaga Biologi Molekular Eijkman, Jakarta. *Plasmodium berghei* adalah salah satu parasit malaria pada rodensia yang mempunyai sifat-sifat mirip dengan *Plasmodium falciparum* yang menginfeksi manusia [1].

Hewan Coba dan Desain Percobaan

Hewan percobaan yang digunakan adalah mencit jantan galur *Swiss Webster* berumur sekitar 2 – 3 bulan dengan berat badan 30–35 gram. Mencit diperoleh dari Kementerian Kesehatan (Kemenkes) Republik Indonesia dan diberi makan pelet dan minum air secara *ad libitum* (tanpa batas). Mencit Swiss sebanyak 10 ekor diinfeksi dengan *P.*

berghei yang diiradiasi 175 Gy pada hari pertama (H0). Infeksi dilakukan dengan cara menyuntikan secara intraperitoneal sebanyak 1×10^7 *P. berghei* stadium eritrositik yang telah diiradiasi. Radiasi dilakukan menggunakan irradiator sinar Gamma ^{60}CO (IRPASENA) di Pusat Aplikasi Teknologi Isotop Radiasi (PATIR), Badan Tenaga Nuklir Nasional (BATAN). Hari ke 7 dan 14 mencit diinfeksi kembali dengan 1×10^7 *P. berghei* stadium eritrositik yang telah diiradiasi 175 Gy. Hari ke 8 dan ke 16 mencit dibunuh dan diambil organ hati dan limpa untuk dibuat preparat histologinya. Mencit yang tersisa

kemudian dipelihara hingga hari ke 40 (satu hari sebelum ujiantang (T-1) dan dibunuh satu ekor mencit dan diambil organ hati dan limpa untuk dibuat preparat histologinya. Hari ke 41 dilakukan ujiantang yaitu dengan menginfeksi *P. berghei* yang tidak diiradiasi sebanyak 1×10^5 terhadap dua ekor mencit yang tersisa. Enam hari pasca ujiantang satu mencit dibunuh untuk dibuat preparat histologi hati dan limpanya. Terakhir pada dua puluh satu hari pasca ujiantang mencit dibunuh untuk dibuat preparat histologi hati dan limpanya (Gambar 1).



Gambar 1. Desain percobaan yang dilakukan pada penelitian

Keterangan:

T-1 : Satu hari sebelum dilakukan ujiantang

T+6 : Enam hari setelah dilakukan ujiantang

T+21 : Duapuluh satu hari sesudah dilakukan ujiantang

Pembuatan Histologi Organ Hati dan Limpa Mencit

Organ hati dan limpa diambil dari mencit yang dibunuh dan dimasukkan ke dalam larutan fiksatif sodium fosfat formalin 10%. Organ hati dan limpa kemudian dikirim ke Fakultas Kedokteran Hewan, Institut Pertanian Bogor (FKH-IPB) untuk dibuat preparat histologisnya. Pewarnaan preparat histologi yang digunakan adalah Hematoksin-Eosin (HE).

Pemeriksaan Histopatologis Organ Hati dan Limpa

Kelainan patologis pada hati dan limpa dilakukan berdasarkan beberapa parameter yaitu keberadaan haemozoin, struktur histologi hati dan limpa serta daya tahan hidup mencit. Pengambilan citra digital dilakukan dengan mikroskop cahaya Nikon E100 yang dilengkapi kamera *Digital Single Lens Reflex* (DSLR) Nikon D5200. Luas area haemozoin pada hati dan limpa dihitung dengan perangkat lunak pengolahan citra digital yaitu ImageJ 1.48^[10].

Etik Penelitian

Prosedur penelitian yang dilakukan telah disetujui oleh komite etik Komisi Etik Penggunaan dan Pemeliharaan Hewan Percobaan, Badan Tenaga Nuklir Nasional (BATAN) berdasarkan surat No.003/KEPPHP-BATAN/X/2012 yang mulai berlaku pada tanggal 29 Oktober 2012 hingga penelitian selesai dilakukan.

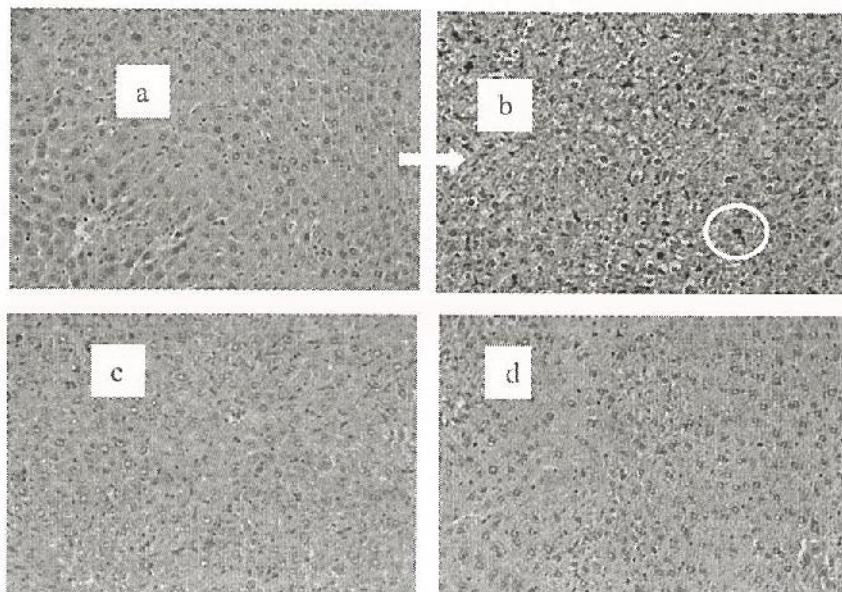
HASIL DAN PEMBAHASAN

Hasil penelitian memperlihatkan bahwa terjadi peningkatan area haemozoin pada preparat histologi hati selama *booster* dan mencapai titik tertinggi pada hari ke 40 (satu hari sebelum dilakukan ujiantang). Pasca ujiantang yaitu pada hari ke 47 dan ke 62 luas area haemozoin kembali menurun (Tabel 1).

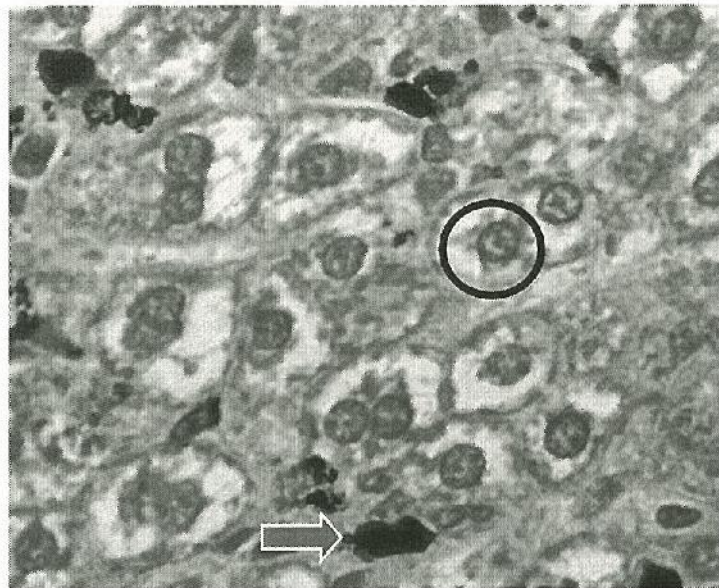
Tabel 1. Luas area haemozoin pada preparat histologi hati mencit pasca *booster* dan ujiantang

Hari Pasca Infeksi	Luas Rerata Arca Haemozoin (µm ²) Pada Preparat Hati
H8	4,44
H16	329,06
H40	2966,86
H47	19,13
H62	12,57

Secara struktur juga terlihat perbaikan pada hari ke 47 dan 62 dibandingkan hari ke 40 (Gambar 2).Kerusakan pada preparat hati di hari ke 40 ditandai dengan banyaknya *cytoplasmic vacuolation* dan *balloning hepatocyte* pada hati. *Cytoplasmic vacuolation* ditandai dengan terdapatnya rongga pada sitoplasma sel hati (Gambar 3). Sedangkan *balloning hepatocyte* ditunjukkan dengan sel hepatosit yang tidak lagi berbentuk heksagonal namun berbentuk seperti balon (Gambar 3). Pada hari ke 47 dan 62 masih ditemukan beberapa sel hati yang mengalami *cytoplasmic vacuolation*, meskipun jumlahnya menurun dibandingkan dengan hari ke 40. Penelitian oleh RajeshBaheti et al., [2003] memperlihatkan bahwa kerusakan yang umum terjadi pada struktur hati penderita malaria akibat *P. falciparum* antara lain adalah timbulnya haemozoin. Sedangkan kerusakan yang jarang ditemukan antara lain adalah terjadinya *balloning hepatocyte*, *cytoplasmic vacuolation* dan *nuclear vacuolation*. Penelitian lainnya oleh Ramachandran et al., [1976] memperlihatkan hal sebaliknya yaitu bahwa *balloning hepatocyte* dan *cytoplasmic vacuolation* merupakan kerusakan kedua dan ketiga yang banyak ditemukan pada struktur hati penderita malaria akibat *P. falciparum* dan *P. vivax*.



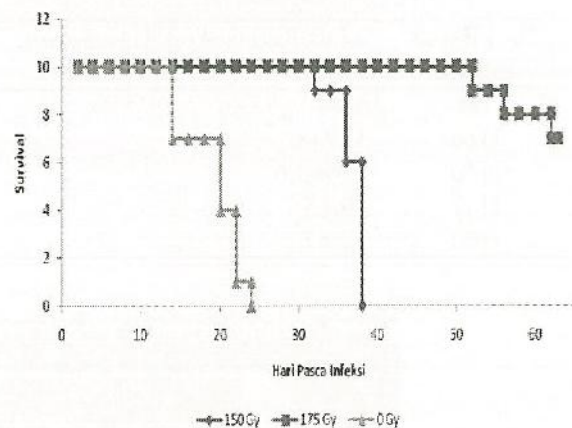
Gambar 2. Histopatologi hati mencit (a) hari ke 8 (b) hari ke 40 (haemozoin dalam lingkaran putih) (c) hari ke 47 (d) hari ke 62



Gambar 3. *Cytoplasmic vacuolation* (panah merah) dan *ballooning hepatocyte* (lingkaran merah) pada preparat hati

Infeksi *P. berghei* pada mencit Swiss bersifat akut dan fatal. Penelitian yang dilakukan oleh Wijayanti et al., [2003] memperlihatkan bahwa pada mencit yang diinfeksi *P. berghei* tidak diiradiasi (0 Gy) akan mati pada sekitar hari ke 8 pasca infeksi. Penelitian Darlina et al., [2007] memperlihatkan bahwa mencit yang diinfeksi dengan *P. berghei* tidak diiradiasi (0 Gy) mempunyai rerata daya tahan hidup 12 hari pasca infeksi. Namun pada penelitian yang dilakukan pada hari ke 8 pasca uji tantang mencit yang diinfeksi dengan *P. berghei* tidak diiradiasi tidak mengalami kematian.

Hal ini menunjukkan bahwa infeksi *P. berghei* yang telah dilemahkan dengan iradiasi 175 Gy pada mencit selama *booster* telah menimbulkan respon imun yang cukup baik sehingga mencit tidak mengalami kematian pasca uji tantang. Pada penelitian ini proses *booster* dan uji tantang juga dilakukan dengan menggunakan *P. berghei* iradiasi 150 Gy. Akan tetapi pada hari ke 38 (3 hari sebelum dilakukan uji tantang) seluruh mencit telah mengalami kematian. Pada kelompok mencit yang diinfeksi berulang menggunakan *P. berghei* tidak diiradiasi seluruh mencit mengalami kematian pada hari ke 24 (15 hari sebelum dilakukan uji tantang) (Gambar 4).



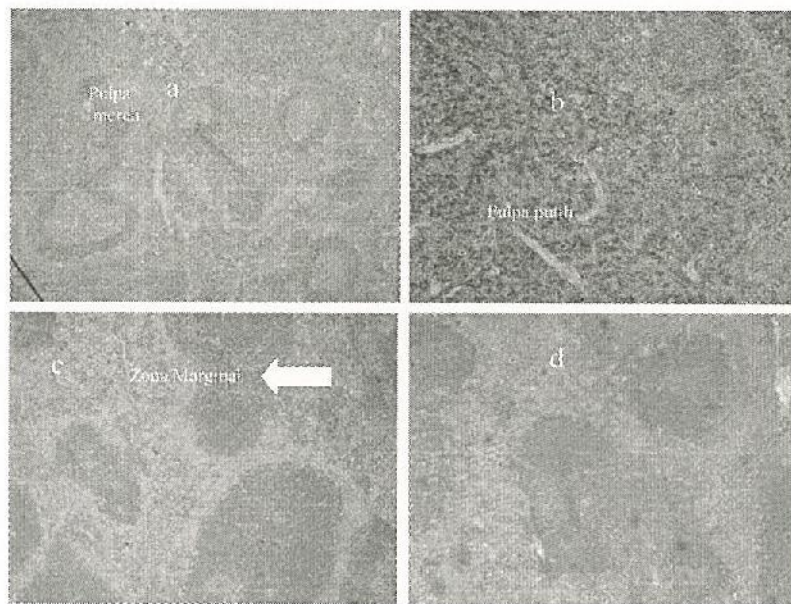
Gambar 4. Grafik daya hidup mencit pasca *booster* dan uji tantang

Berbeda dengan hati pada limpa luas area haemozoin secara keseluruhan lebih tinggi dan nilai tertinggi terlihat pada hari ke 40 (Tabel 2). Fenomena yang sama yaitu terjadi penurunan luas area haemozoin pasca uji tantang juga terjadi di limpa.

Tabel 2. Luas area haemozoin pada preparat histologi Limpa mencit pasca booster dan ujiantang

Hari Pasca Infeksi	Luas Rerata Area Haemozoin (μm^2) Pada Preparat Limpa
H8	32,691
H16	21,301
H40	6552,801
H47	653,394
H62	486,574

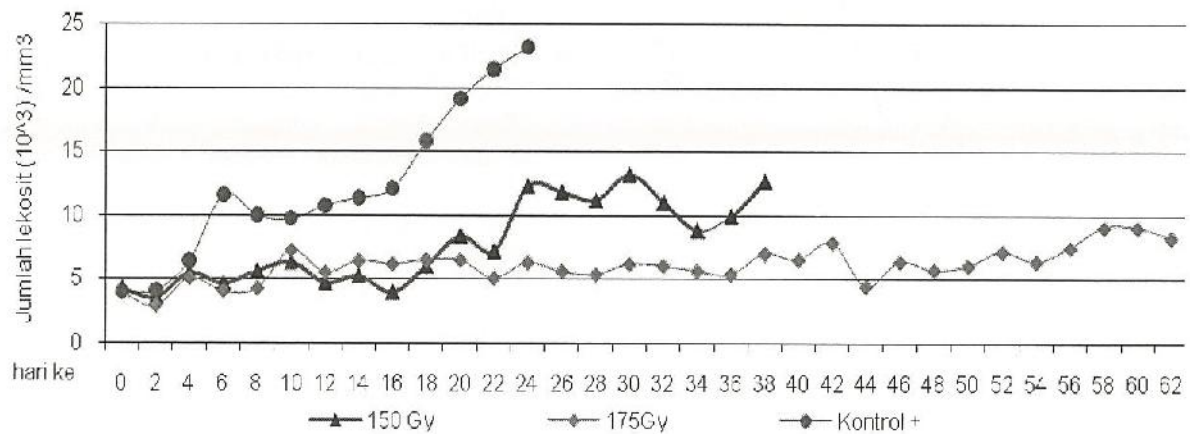
Secara struktur pada limpa juga terlihat perbaikan pada hari ke 47 dan 62 dibandingkan hari ke 40 (Gambar 5c dan 5d). Terlihat pada hari ke 40 struktur limpa sudah rusak dan sulit dibedakan antara pulpa putih (*white pulp*) dan pulpa merah (*red pulp*), serta banyak terlihat haemozoin pada preparat limpa (Gambar 5b). Haemozoin pada preparat limpa pada hari ke 40 terletak pada pulpa merah yang mengindikasikan bahwa pulpa merah merupakan tempat utama dalam limpa untuk menghilangkan eritrosit yang terinfeksi oleh parasit malaria.



Gambar 5. Histopatologi limpa mencit (a) hari ke 8 (b) hari ke 40 (c) hari ke 47 (d) hari ke 62

Dari hasil pengamatan jumlah eritrosit mencit pasca ujiantang, menunjukkan bahwa jumlah eritrosit mencit dosis 175 Gy masih

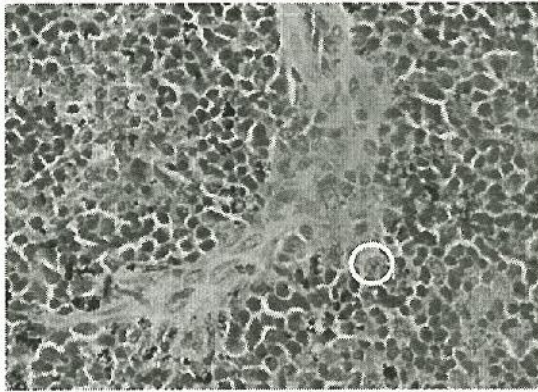
dapat diamati sampai hari ke 62 sedang dosis 0 dan 150 Gy mati pada hari ke 22 dan 38 (Gambar 6).



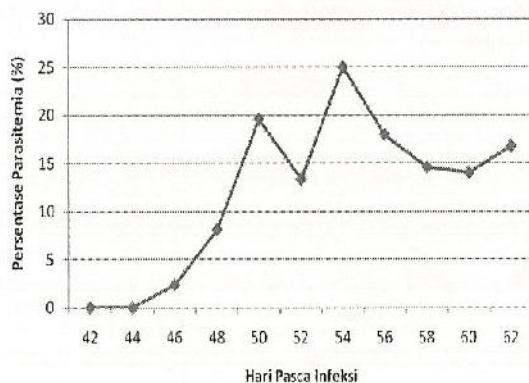
Gambar 6. Jumlah eritrosit mencit pasca Imunisasi dan ujiantang

Pada preparat limpa hari ke 40 banyak ditemukan *cytoplasmic vacuolation* pada sel limpa (Gambar 7), hal tersebut dikarenakan terjadi gangguan pada metabolisme lemak. Penelitian Dkhil [2009] memperlihatkan fenomena yang sama yaitu haemozoin lebih banyak ditemukan pada pulpa merah dan terlihat terjadi *cytoplasmic vacuolation* pada sel limpa mencit pasca infeksi *Plasmodium chabaudi*.

Pada penelitian dilakukan penghitungan persentase parasitemia pasca ujiantang. Persentase parasitemia memperlihatkan terjadinya peningkatan pada hari ke 46 (5 hari pasca ujiantang) dan mencapai nilai tertinggi pada hari ke 54 yaitu sebesar 24,95%. Persentase parasitemia kemudian menurun setelah melewati hari ke 54 (Gambar 8).



Gambar 7. *Cytoplasmic vacuolation* pada sel limpa (dalam lingkaran putih).



Gambar 8. Persentase parasitemia pasca ujiantang

KESIMPULAN

Berdasarkan hasil penelitian dapat disimpulkan bahwa imunisasi berulang (*booster*) dengan *P. berghei* stadium eritrositik iradiasi 175 Gy memberikan respon imun yang cukup baik sehingga mencit tidak mengalami kematian pasca ujiantang. Penelitian lanjutan untuk mengetahui daya tahan mencit pasca imunisasi berulang dan ujiantang hingga melewati hari ke 62 perlu dilakukan.

DAFTAR PUSTAKA

1. Wijayanti AM, Hendrina E., dan Mardihusodo YS, Efek bee propolis terhadap infeksi *Plasmodium berghei* pada mencit Swiss. *Berkala ilmu Kedokteran* 35: 81-89. (2003)
2. Carvalho LJM, Daniel-Ribeiro CT., dan Goto H, Malaria vaccine: candidate antigens, mechanisms, constraints and prospects. *Scand J Immunol* 56: 327-343.(2002)
3. Syaifudin M, Tetriana D, Darlina dan Nurhayati S, The Feasibility of Gamma Irradiation for Developing Malaria Vaccine. *Atom Indonesia* 37: 91-101. (2011)
4. Wijayanti MA, Socripto N, Supargiyono., dan Fitri LE., Pengaruh Imunisasi Mencit dengan Parasit Stadium Eritrositik Terhadap Infeksi *Plasmodium berghei*. *Berkala Ilmu Kedokteran* 2: 53-59. (1997)
5. Hoffman SL, Goh ML., dan Luke TC., Protection of humans against malaria by immunization with radiationattenuated *Plasmodium falciparum*. *The Journal of Infectious Diseases* 185: 1155- 1164. (2002)
6. Darlina., dan Tetriana D., Studi Awal Pengembangan Vaksin Malaria Dengan Teknik Nuklir: Pengaruh Iradiasi Gamma Pada *Plasmodium berghei* Terhadap Daya Tahan Mencit (Prosiding Seminar Nasional Sains dan Teknologi Nuklir PTNBR – BATAN Bandung, 17 – 18 Juli 2007). Pusat Teknologi Nuklir Bahan dan Radiometri, Badan Tenaga Nuklir Nasional, Jakarta (2007) 299-303. (2007)
7. Darlina, Kisananto T., dan Mailani W., Proliferasi Limfosit Mencit Yang Diimunisasi dengan *Plasmodium berghei* radiasi 175 Gy (Prosiding Pertemuan dan

- Presentasi Ilmiah - Penelitian Dasar Ilmu Pengetahuan dan Teknologi Nuklir 2012, PTAPB – BATAN Yogyakarta, 4 Juli 2012). Pusat Teknologi Akselerator dan Proses Bahan, (2012) 148-153 (2012).
8. Aidoo E, Addai FK, Ahenkorah J, Hottor B, Bugyei KA., dan Gyan BA., Natural cocoa ingestion reduced liver damage in mice infected with *Plasmodium berghei* (NK65). *Research and Reports in Tropical Medicine* 3: 107–116. (2012)
 9. Alves HJ, Weidanz W., dan Weiss L., The spleen in murine *Plasmodium chabaudi* adami malaria: stromal cells, T lymphocytes, and hematopoiesis. *Am J Trop Med Hyg* 55: 370-378. (1996)
 10. Ramadhani D, Rahardjo T, Nurhayati S., Automated Measurement of Haemozoin (Malarial Pigment) Area in Liver Histology Using ImageJ 1.6. Prosiding 6th Electrical Power, Electronics Communication, Control and Informatics Seminar (EECCIS), Malang. (2012)
 11. Rajeshbaheti, Laddha P., dan Gehlot RS., Liver Involvement in *Falciparum* Malaria – A Histo-pathological Analysis. *Journal Indian Academy of Clinical Medicine* 4: 34-38.(2003)
 12. Ramachandran S., dan Perera MV., Jaundice and hepatomegaly in primary malaria. *Journal of Tropical Medicine and Hygiene* 79: 207-210. (1976)
 13. Dkhil MAE., Apoptotic changes induced in mice splenic tissue due to malaria infection. *J Microbiol Immunol Infect* 42: 13-18. (2009)